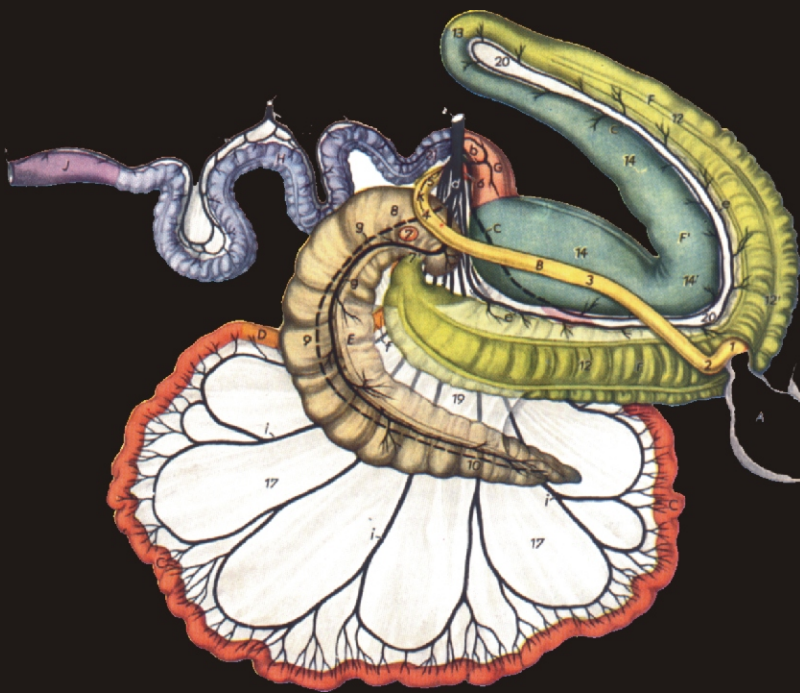


# NACHWEIS DER PROLIFERATION DES MAGEN- UND DARMEPITHELIS VON NEUGEBORENEN UND ADULTEN PFERDEN MITTELS KI-67



**MATYAS TATAR**

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

le to think ... Niels Bohr

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär- Anatomie,  
-Histologie und -Embryologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. M. Kressin

**Nachweis der Proliferation des Magen-  
und Darmepithels von neugeborenen  
und adulten Pferden mittels Ki-67**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**MATYAS TATAR**

Tierarzt aus Schwedt

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Kressin

2. Berichterstatter: PD Dr. T. Hübschle

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2005

Meinen lieben Eltern

<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>6</b>
<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>9</b>
MORPHOLOGIE DES MAGEN-DARM-TRAKTES BEIM PFERD .....	9
HISTOLOGISCHER AUFBAU DES MAGEN-DARM-TRAKTES .....	11
PROLIFERATION.....	12
LOKALISATION DER PROLIFERIERENDEN ZELLEN .....	14
KI-67.....	14
FUNKTION DES KI-67 PROTEINS .....	17
IMMUNHISTOCHEMISCHE BESTIMMUNG DER EXPRESSION VON KI-67 .....	17
PROLIFERATION IM MAGEN-DARM-TRAKT .....	18
<i>Neugeborene</i> .....	18
<i>Adulte</i> .....	19
<b>III. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
MATERIAL / GEWEBE .....	20
FIXIERUNG DER PROBEN .....	22
<i>Herstellung der einzelnen Lösungen</i> .....	22
BESCHICHTUNG DER OBJEKTTRÄGER (OT) .....	24
HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN .....	24
HE-FÄRBUNG.....	24
IMMUNHISTOCHEMIE .....	25
<i>Übersicht über die verwendeten Substanzen</i> .....	26
VERSUCHSPROTOKOLL .....	26
QUANTITATIVE AUSWERTUNG VON KI-67 .....	29
STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	30
<b>IV. ERGEBNISSE.....</b>	<b>31</b>
LICHTMIKROSKOPISCHE BEFUNDE .....	31
<i>Magen</i> .....	31
<i>Darm</i> .....	32
AUSZÄHLUNG UND STATISTIK.....	43
<b>V. DISKUSSION .....</b>	<b>49</b>
KI-67 IM MAGEN .....	49
KI-67 IM DARM .....	50
PROLIFERATION BEI FOHLEN / ADULTEN PFERDEN .....	51
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>59</b>
<b>VII. SUMMARY.....</b>	<b>61</b>
<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>62</b>
<b>IX. ANHANG.....</b>	<b>72</b>
TABELLEN .....	72
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>77</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	<b>A</b> vidin <b>B</b> iotin <b>C</b> omplex
AEC	3- <b>A</b> mino-9- <b>E</b> thylcarbazol
Ag	<b>A</b> ntigen
BBS	<b>B</b> ombesin
Cap. caec.	Caput caeci
Corp. caec.	Corpus caeci
CCK	<b>C</b> holecystokin <b>i</b> n
cDNA	complementary (coding) <b>DNA</b>
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
Col. desc.	Colon descendens
Col.dors.dext.	Colon ascendens dorsale dextrum
Col.dors.sin.	Colon ascendens dorsale sinistrum
Col.ventr.dext.	Colon ascendens ventrale dextrum
Col.ventr.sin.	Colon ascendens ventrale sinistrum
DNA (DNS)	<b>D</b> esoxyribonukleinsäure
EGF	<b>E</b> pidermal <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
EM	<b>E</b> lektronen <b>m</b> ikroskopie
F	<b>F</b> ohlen
G <sub>0</sub> ,G <sub>1</sub> ,G <sub>2</sub>	Phasen des Zellzyklus
GLP	<b>G</b> lucagon- <b>l</b> ike <b>P</b> eptide
HE	<b>H</b> ämatoxylin- <b>E</b> osin
HCl	Salzsäure
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat-Ionen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffsuperoxid
IgA	<b>I</b> mmunglobulin <b>A</b>
IGF	<b>I</b> nsulin-like <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
IgG	<b>I</b> mmunglobulin <b>G</b>
IHC	<b>I</b> mmun <b>h</b> istochemie
JLU	<b>J</b> ustus- <b>L</b> iebig- <b>U</b> niversität
K <sup>+</sup>	Kaliumionen

KCl	Kaliumchlorid
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
KiZ	Ki-67 positive Zelle
Lamina musc.	Lamina muscularis
LZ	Lymphozyt
MDT	<b>Magen-Darm-Trakt</b>
mRNA (mRNS)	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
MIB-1	<b>M</b> olecular <b>I</b> mmunology <b>B</b> orstel-1
NaCl	Natriumchlorid
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	di-Natriumhydrogenphosphat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Natriumdihydrogenphosphat-mono-hydrat
NaOH	Natronlauge
NHS	<b>N</b> ormal <b>H</b> orse <b>S</b> erum
NT	<b>N</b> eurotensin
ODN	<b>O</b> ligodeoxyribonucleotide
OT	Objektträger
Pars nongland.	Pars nonglandularis
PCNA	<b>p</b> roliferating <b>c</b> ell <b>n</b> uclear <b>a</b> ntigen
PBS	<b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
Pi	<b>P</b> roliferationsindex
S	<b>S</b> ynthese
Tris	<b>T</b> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan



## **I. Einleitung**

In dieser Arbeit wird erstmals die Zellproliferation mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 im klinisch unauffälligen Magen-Darm-Trakt (MDT) von Pferden nachgewiesen. Untersucht wird hierbei der MDT zweier verschiedener Altersklassen im Hinblick auf die Zellteilung im Epithelgewebe. Es werden jeweils verschiedene Bereiche aus dem Magen, dem Dünndarm und dem Dickdarm von Fohlen bzw. neugeborenen Pferden sowie von adulten Pferden untersucht.

Dabei bestand die Fragestellung, ob das Ki-67-Antigen, bekannt als wichtiger Proliferationsmarker nicht nur aus der Humanmedizin, am Magen- und Darmgewebe bei Pferden mit Hilfe des MIB-1-Antikörpers (Molecular Immunology Borstel-1) überhaupt nachzuweisen ist. Weiterhin war es Ziel dieser Arbeit festzustellen, ob sich eine Aussage über die Lokalisation der Zellteilung im Magen- und Darmepithel treffen lässt und diese mit anderen Säugetieren vergleichbar ist und ob es bezüglich der Proliferation Unterschiede zwischen Fohlen und adulten Pferden gibt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich im Hinblick auf bestimmte Erkrankungen des MDT, Erkenntnisse gewinnen lassen bzw. im Vergleich zwischen den beiden Probandengruppen, Unterschiede zu finden sind, die auf eine unterschiedliche Proliferationsrate zurückzuführen sind.

## **II. Literaturübersicht**

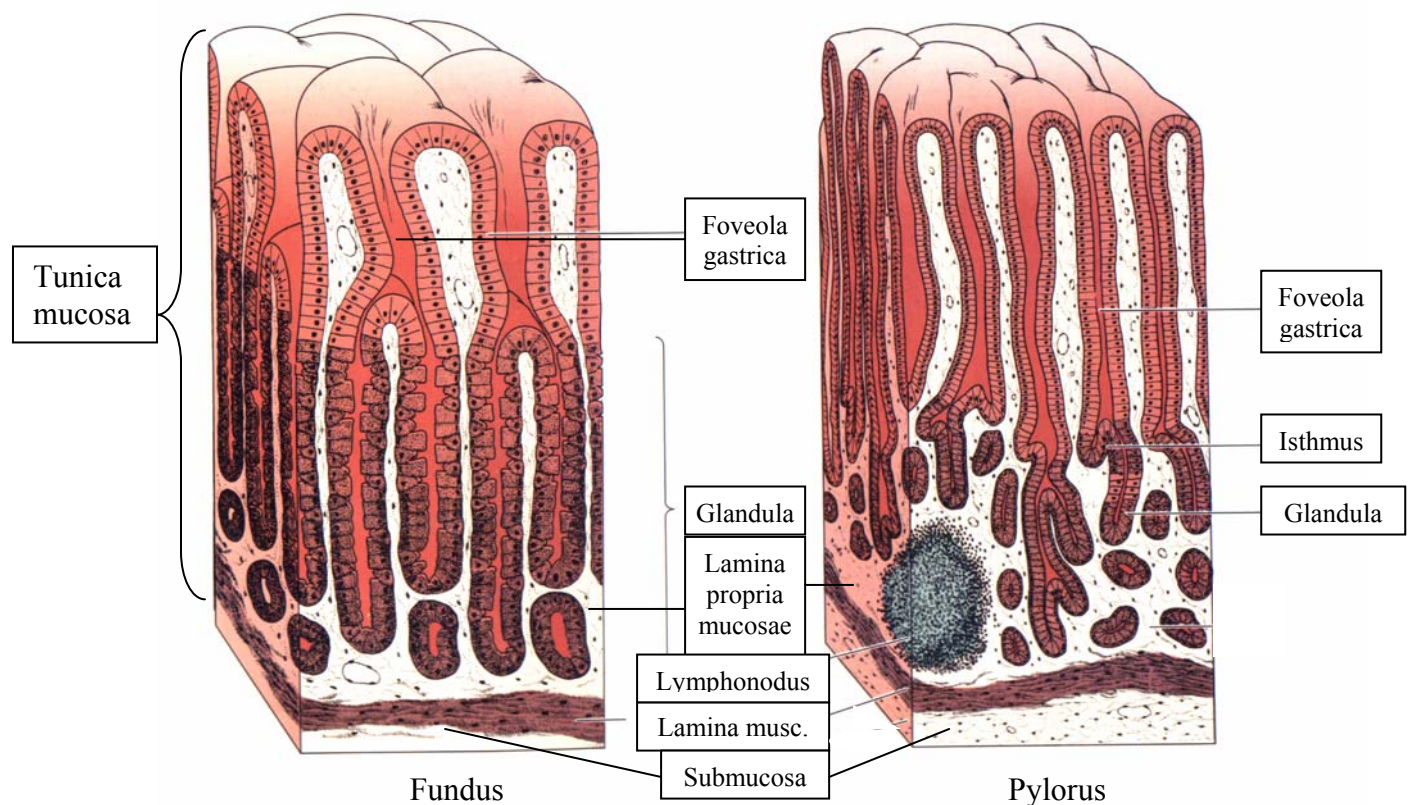
### **Morphologie des Magen-Darm-Traktes beim Pferd**

Der Magen-Darm-Trakt (MDT) des Pferdes ist in der Literatur nur spärlich beschrieben, oft wird er als Vergleichsobjekt zu anderen Spezies herangezogen, ihm selber sind jedoch nur wenige Arbeiten gewidmet. Im Gegensatz zu den anderen bei uns als Haussäugetiere gehaltenen Herbivoren ist der gesamte Verdauungstrakt etwas größer, vor allem im Bereich des Dickdarmes nimmt er gewaltige Ausmaße an und ist deshalb nicht zuletzt oft Grund für Komplikationen und darauf folgendes tierärztliches Eingreifen. Betrachtet man die einzelnen Abschnitte des MDT so fällt auf, dass der einhöhlige-zusammengesetzte Magen mit einem Fassungsvermögen von nur 8 – 15 Litern im Durchschnitt, verhältnismäßig klein ausfällt (Nickel et al. 1987).

Der Darmkanal weist die typischen Abschnitte vieler anderer Säugetiere auf, man unterscheidet hier grundsätzlich in Dün- und Dickdarm, wobei jeder dieser Abschnitte noch weiter zu differenzieren ist. (Siehe auch Übersicht Seite 21)

Von den drei Abschnitten des Dünndarmes, dem Duodenum, dem Jejunum und dem Ileum ist das Jejunum mit Abstand der längste Teil des Dünndarmes. Im Durchschnitt weist es eine Länge von ca. 25 m auf. Der Dickdarm zeichnet sich, wie schon oben erwähnt, durch beträchtliche Ausmaße und charakteristische Ausgestaltung seiner verschiedenen Abschnitte aus. Das Caecum (Blinddarm) ist mit einer Länge von etwa einem Meter und einem Fassungsvermögen von im Mittel 33 l nicht nur sehr groß, es nimmt auch eine Sonderstellung im Hinblick auf Form und Funktion ein. Man unterscheidet an ihm den Blinddarmkopf, die Basis caeci, eine große und eine kleine Krümmung, sowie das Corpus und die Apex caeci. Das Kolon wird in Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens unterschieden. Caecum und Colon ascendens nehmen die Stellung der Vormägen der Wiederkäuer ein, sie stellen "Gärkammern" dar und dienen der Zelluloseverdauung (Nickel et al. 1987). Beim Colon ascendens sind vier verschiedene Anteile zu bezeichnen. Diese werden nach Lage im Körper unterschieden in Colon ventrale dextrum, dieses geht über in das Colon ventrale sinistrum, schlägt dann um in das Colon dorsale sinistrum und der Endteil des Colon ascendens, das Colon dorsale dextrum wird aufgrund seiner beträchtlichen Größe auch als magenähnliche Erweiterung bezeichnet. Dem folgt das Colon transversum und dann in Richtung Becken ziehend das Colon descendens, welches dann in den letzten Darmabschnitt, das Rektum, übergeht.

Der einhöhlige Magen weist eine unterschiedliche Innenauskleidung auf. So kann man die Pars proventricularis mit kutaner, drüsenloser Schleimhaut und den leicht erhabenen Margo plicatus mit einzelnen Kardiadrüsen als Abgrenzung zur Pars glandularis unterscheiden. Die Pars glandularis gliedert sich in zwei Regionen: die mit deutlichen Foveolae und Areae gastricae ausgestattete Region der Glandulae gastricae propriae, sowie die Region der Pylorusdrüsen. (Bild 1)



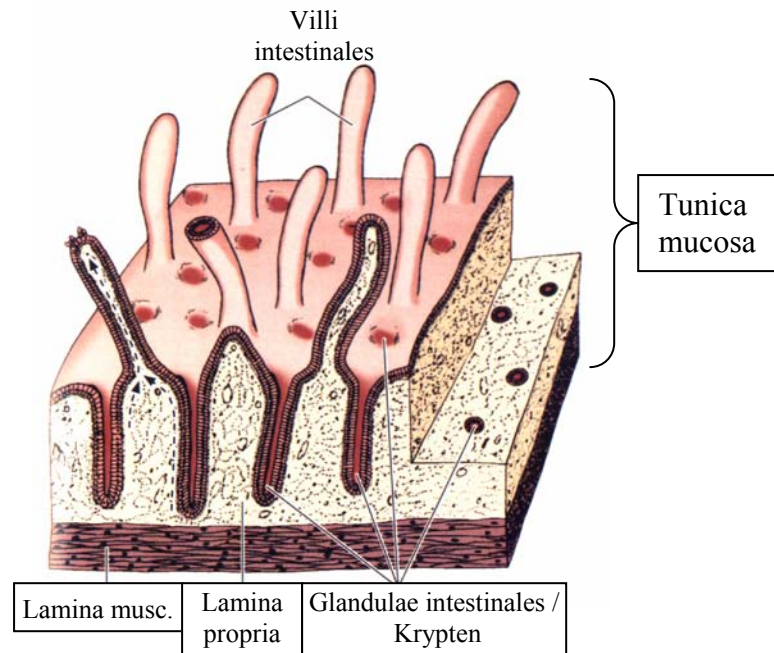
**Bild 1:** Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus des Fundus ventriculi und der Pars pylorica des Säugermagens (modifiziert nach: Young und Heath 2002)

## Histologischer Aufbau des Magen-Darm-Traktes

Die Innenauskleidung des gesamten Magen-Darm-Traktes weist grundsätzlich einen gleichartigen Grundbauplan auf. Vom Lumen nach außen hin sind folgende Schichten zu nennen :

- Tunica mucosa
  - Epithelium mucosae,
  - Lamina propria mucosae,
  - Lamina muscularis mucosae,
- Tela submucosa,
- Tunica muscularis
  - Stratum circulare,
  - Stratum longitudinale,
- Tunica adventitia, anstelle einer Tunica adventitia kann ausgebildet sein eine
- Tela subserosa,
- Tunica serosa
  - Lamina propria serosae,
  - Mesothelium serosae (Liebich 1993).

Diese verschiedenen Schichten kann man in unterschiedlich starken Ausprägungen den gesamten MDT durchziehend beobachten. Siehe auch Bild 1 und 2.



**Bild 2:** Schematische Darstellung der Dünndarmschleimhaut eines Säugers (modifiziert nach: Young und Heath 2002)

In der Tunica mucosa, der Schleimhaut, die beim Säuger die verschiedensten Zelltypen beherbergt und für Sekretion, Resorption und andere physiologische Prozesse wichtig ist, findet die Proliferation der Epithelzellen statt.

Erste detaillierte Beschreibungen von Proliferationsvorgängen stammen aus dem Magenepithel von Ratten (Stevens und Leblond 1953), auch bei Hunden wurde in früheren Untersuchungen die Proliferation von Epithelzellen in der Mucosa beobachtet (Willems et al. 1972). Willems und Lehy (1975) sprechen hierbei von einem kontinuierlichen Erneuerungsprozess der in der Mucosa ansässigen Drüsenepithelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass Gastrin zu einer verstärkten Proliferation der Epithelzellen führte.

## **Proliferation**

Unter Proliferation versteht man die Teilung von Zellen als einen geordneten Ablauf von Ereignissen, während der aus einer Mutterzelle zwei oder mehrere komplette Tochterzellen entstehen. Meistens sind die Tochterzellen mit der Mutterzelle genetisch identisch, wie es bei der mitotischen Teilung der Fall ist. Die Vermehrung von einzelligen Prokaryoten sowie Wachstum und Zellerneuerung bei vielzelligen Organismen geschieht über mitotische Teilungen.

Die meiotische Teilung ist eine besondere Form der Zellteilung und ist keine wirkliche Proliferation, da die Tochterzellen nur die Hälfte des genetischen Materials der Mutterzelle erhalten (Reduktionsteilung) und bei der außerdem eine Neukombination von Genen stattfindet. Diese Teilung geschieht nur in bestimmten Stadien eines Lebenszyklus und ist bei vielzelligen Organismen auf bestimmte Zellen, die Zellen der Keimbahn, beschränkt.

Bei der Zellteilung muss man generell zwischen der Zellteilung prokaryotischer und der eukaryotischer Zellen unterscheiden. Bei beiden Zelltypen läuft die Zellteilung weitestgehend ähnlich ab, hier soll jedoch nur auf die Teilung der eukaryotischen Zellen eingegangen werden.

Bei der mitotischen Teilung machen die Chromosomen eine Reihe charakteristischer Veränderungen durch, die in 4 Phasen ablaufen: Unmittelbar nach Beendigung der Mitose treten proliferierende Zellen in die sogenannte G1 Phase (G=gap=Lücke), danach kann die einzelne Zelle entweder in die G0 Phase übergehen und dort verharren, oder zur nächsten Teilung voranschreiten. Vor der eigentlichen Mitose kommt es dann zur S-Phase (S=Synthese), zwischen dieser und der nachfolgenden Mitose liegt die G2-Phase, nach der Mitose folgt eine Ruhephase.

Zusammengefasste Darstellung des Zellzyklus:

**⇒ G0 / G1 – S – G2 – Mi – G0 / G1**

Mit der Bestimmung der Proliferation von Zellen musste man sich früher auf die Zählung der lichtmikroskopisch erkennbaren Mitosefiguren beschränken. Diese Methode stößt in vielen Geweben auf ihre Grenzen und ist zum Teil auch sehr aufwendig. Der hier durchgeführte Proliferationsnachweis mit Hilfe des Antikörpers gegen Ki-67 ist eine moderne zuverlässige Methode und in zahlreichen Arbeiten beschrieben (Karlsson et al. 1996; Gerlach et al. 1997; Endl und Gerdes 2000). Er bietet aufgrund seiner Spezifität eine exakte und relativ einfache Alternative zu anderen Proliferationsbestimmungen. Andere Verfahren zur Untersuchung der Proliferation in Paraffin-fixiertem Gewebe sind die 5-Bromodeoxyureidin (BrdU) Immunhistochemie, die PCNA Immunhistochemie, sowie die In-Situ-Hybridisierung (ISH) für die Histonen-mRNA. Die Vorteile der Ki-67-Methode liegen in der Praktikabilität, es entstehen geringere Kosten und das Ki-67 Protein ist nahezu während des gesamten Zellzyklus nachweisbar, mit Ausnahme der G0-Phase und einer undeutlichen Anfärbung während der S-Phase bei Verwendung des MIB-5 (Kee et al. 2002; Muskhelishvili et al.

2003). In vielen Untersuchungen wurde die Ki-67-Methode bereits verwendet, vor allem in der Humanmedizin ist sie seit Jahren hauptsächlich in der Tumordiagnostik etabliert (Brown et al. 1990; Jansen et al. 1998; Reszec et al. 2004). Auch in der Veterinärmedizin wird in zahlreichen Arbeiten Ki-67 als Proliferationsmarker eingesetzt (Narama et al. 1996; Griffey et al. 1999; Roels et al. 1999). Befunde zur Proliferation am Magen- und Darmepithel vom Pferd liegen bislang nicht vor.

### **Lokalisation der proliferierenden Zellen**

Untersuchungen zur Proliferation im Verdauungstrakt wurden vor allem an Labortieren durchgeführt, da hier die Probenbeschaffung und die Standardisierung von Untersuchungsmethoden einfacher vonstatten gehen.

Übereinstimmend konzentriert sich die Proliferation im Bereich der Fundus- und Pylorusdrüsen im Magen von Mäusen, auf den Isthmus der Glandulae gastricae (Kataoka et al. 1986; Karam 1999; Kinoshita et al. 2000). Im Darmepithel findet die Proliferation der Enterozyten im Bereich der Krypten des Epithels statt, und bleibt in deren unterem Drittel. Näher zur Epitheloberfläche, zum Lumen hin, sind meist nur noch postmitotische Zellen zu finden (Gordon et al. 1994; Karam 1999; Slack 2000).

### **Ki-67**

Ki-67 ist ein Zellkernprotein, welches Anfang der 80er Jahre von Gerdes et al. (1983) entdeckt und genauer definiert wurde. Es kann während der G1-, S-, G2- und M-Phase, nicht jedoch in der G0- bzw. Ruhe-Phase des Zellzyklus nachgewiesen werden (Endl und Gerdes, 2000). Folglich ist es bei der Teilung von Zellen immer vorhanden und kann daher als Marker für den Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation verwendet werden. Die Expression von Ki-67 erfolgt während der Mitose, sie beginnt in der Mitte der G1-Phase, der Spiegel steigt im Laufe der Synthese- und G2- Phasen an und erreicht seinen Höhepunkt in der Mitose-Phase (Gerdes et al. 1984; Sasaki et al. 1987). Mit dem Ende der Mitose-Phase erfolgt ein rascher Abbau mit einer Halbwertszeit von weniger als einer Stunde (Bruno et al. 1992).

Seinen Namen erhielt das Protein aufgrund der Tatsache, dass in einem Labor in Kiel („Ki“) der monoklonale Antikörper gegen das spätere “Ki-67“-Antigen in der 67. Vertiefung der damals verwendeten Mikrotiterplatte Primärwachstum zeigte.

Das Kernantigen kommt nicht nur in humanem Gewebe (Gerdes et al. 1983), sondern auch in gesunden und neoplastischen Geweben zahlreicher Säugetierspezies, wie z.B. Rind, Schaf, Kaninchen, Ratte, Katze, Hund und Pferd vor (Falini et al. 1989).

Bei einer Reihe von Tumoren, wie Prostata- und Mammakarzinomen beim Menschen, konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil Ki-67-positiver Zellen an der Gesamtpopulation von prognostischer Relevanz ist (Aaltomaa et al. 1997; Jansen et al. 1998).

Heutzutage wird der Ki-67-Nachweis des Proliferationsantigens zum Beispiel in der histopathologischen Routinediagnostik verwendet und zur Darstellung physiologischer Proliferationsvorgänge u.a. auch beim Hund herangezogen (Laprie et al. 1998; Wilke 2000). Es dient der Charakterisierung und Diagnose von caninen Lungentumoren (Griffey et al. 1999) und Mammatumoren (Lohr et al. 1997). Es lassen sich mit Hilfe von Ki-67 degenerative Veränderungen am Ligamentum cruciatum des Hundes, sowie prädisponierende Faktoren für Kreuzbandrisse nachweisen (Narama et al. 1996). Verwendet wird es auch zur Bestimmung des Proliferationsindex von malignen Lymphomen beim Menschen im Hinblick auf eine Verbesserung der Prognostik (Krogh-Jensen et al. 1998). Als wertvollster Proliferationsmarker im Vergleich zu anderen wird die Ki-67-Expression bei der Untersuchung konjunktivaler und palpebraler Tumoren des Menschen beschrieben (Reszec et al. 2004).

Wachsende Bedeutung kommt dem Nachweis von Ki-67 Antigen auch in der veterinärmedizinischen Prognostik zu. So korreliert ein hoher Anteil Ki-67 positiver Zellen in Melanomen bei Hunden und Katzen mit einer niedrigeren Lebenserwartung der betroffenen Tiere (Roels et al. 1999). In der gleichen Studie wurden auch andere Kriterien, wie zum Beispiel PCNA (proliferating cell nuclear antigen) untersucht, diese ergaben jedoch keine verlässlichen Ergebnisse im Hinblick auf die Prognose.

Durch den immunhistochemischen Nachweis des Ki-67 Antigens konnten proliferierende Zellen erstmals während der Ontogenese des Labmagenepithels des Rindes lokalisiert werden (Sommer et al. 2001).

Proliferationsmarker wurden am Magen-Darm-Trakt vom Pferd bislang nicht eingesetzt. Die wenigen Arbeiten, in denen das Ki-67 Antigen zum Nachweis der Proliferation in equinem Gewebe verwendet wurde, beschreiben hauptsächlich Proliferationsvorgänge in neoplastischem Gewebe. So beschreiben Kelley und Mahaffey (1998) als erste den Gebrauch



des Proliferationsmarkers Ki-67 als diagnostisches Mittel in der histopathologischen Bestimmung von malignen Lymphomen beim Pferd. Bedeutung kommt dem Nachweis von Ki-67 nicht nur für die Diagnostik und Prognostik zu, sondern auch für die Erfolgskontrolle von Therapien, so wurde über die erfolgreiche Therapie eines equinen präputialen Fibrosarkoms unter Verwendung eines Zytostatikums berichtet. Hierbei wurden Proliferationsbestimmungen (Ki-67) an den Biopтатаen aus dem Tumorgewebe vor erfolgter Therapie und danach durchgeführt, nach der Therapie war keine weitere Tumorbildung zu beobachten. Die Autoren postulieren, dass die quantitative Bestimmung der Tumorzellproliferation im Hinblick auf die Aussage über einen Therapieerfolg genutzt werden könnte. Darüber lässt sich eine Aussage treffen ob eine bestimmte Zellpopulation weiter vermehrtes Wachstum zeigt oder wie in der durchgeführten Studie kein Wachstum mehr zu erkennen ist (Roels et al. 1998). Anders als in der Humanmedizin lässt sich jedoch dieser Proliferationsmarker nicht für die Unterscheidung zwischen Benignität und Malignität bei ganz bestimmten Tumoren verwenden. Bei equinen Melanomen wurde zwar ein signifikanter Unterschied zu normalem Gewebe in Bezug auf die Proliferationsrate festgestellt, aber es waren hinsichtlich der Menge an proliferierenden Zellen keine deutlichen Unterschiede zwischen gutartigen und bösartigen Tumoren zu erkennen (Roels et al. 2000). Anhand der Untersuchung einer Anzahl von equinen Sarkoiden konnte ebenfalls keine Unterscheidung zwischen den klinischen Typen der Tumoren, mittels Proliferationsmessung mit Ki-67, getroffen werden (Martens et al. 2000). Abgesehen von der Tumordiagnostik bei Pferden findet der Proliferationsmarker auch Anwendung in der Reproduktionsmedizin. So wurde beschrieben, dass die Geschwindigkeit der Vaskularisierung des Corpus luteum beim Wachstum, sowie der Rückbildung des Gelbkörpers beim Pferd eine wichtige Rolle spielt. Daher wurde die Teilungsrate der Endothelzellen, in den verschiedenen Stadien des Zyklus der Stute, gemessen und in Relation zu der Konzentration des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor gesetzt und man fand heraus, dass es eine zeitliche Korrelation beider Faktoren gibt (Al zi'abi et al. 2003). Der Nachweis der Expression von Ki-67 ist Grundlage einer weiteren Studie in der die Proliferationsrate im Endometrium gemessen und diese Ergebnisse mit der Expressionsrate der dort lokalisierten Hormonrezeptoren verglichen wurde, wobei sich ein Zusammenhang beider Faktoren ergab (Aupperle et al. 2000). Gerstenberg et al. beschrieben in zwei aufeinanderfolgenden Arbeiten die quantitative Bestimmung der Proliferation von Endometriumzellen mit Ki-67, zum einen während des normalen Sexualzyklus, zum anderen während der Plazentation bei Stuten (Gerstenberg et al. 1999a; Gerstenberg et al. 1999b).

## **Funktion des Ki-67 Proteins**

Trotz der vielen Einsatzmöglichkeiten des Nachweises des Ki-67 Antigens gibt es nach bisherigen Analysen keinen eindeutigen Hinweis auf die physiologische Funktion von Ki-67 (Brown und Gatter 1990; Gerdes et al 1991, 1992). Eine Stabilisierung der DNA wird ebenso postuliert (Sawhney und Hall 1992) wie eine Rolle bei der Zerstörung der Kernmembran zu Beginn der Mitose (Gerdes et al. 1991, 1992). Ki-67 ist ein Chromatin-Protein, das mit anderen Heterochromatin-Proteinen interagiert, phasenabhängig aber seine zelluläre Lokalisation ändert (Scholzen et al. 2000). Während der Kondensierung der Chromosomen und der Separation der Schwester-Chromatiden in der Mitose wird Ki-67 phosphoryliert. So wurde nach Zugabe von bestimmten Oligodeoxyribonucleotiden, gegen die Ki-67 mRNA gerichtet, eine deutliche Abnahme der Proliferation von Tumorzellen, sowie eine Zunahme der Apoptose von Zellen beobachtet (Kausch et al 2003). Ki-67 ist essentiell für die Zellvermehrung. Die cDNA des Ki-67-Proteins wurde in vier verschiedenen Tumor-Zelllinien auf Mutationen hin untersucht, dabei wurden mehrere Mutationen in der cDNA entdeckt und daraus geschlossen dass möglicherweise hier eine genetische Basis für die Entstehung von Tumoren besteht (Buban et al. 2004).

## **Immunhistochemische Bestimmung der Expression von Ki-67**

Zum Nachweis des Proteins werden verschiedene Antikörper verwandt, wobei am häufigsten der monoklonale Antikörper MIB-1 (*Molecular Immunology Borstel-1*) eingesetzt wird (Scholzen et al. 2000). Dieser 1992 erstmals beschriebene Antikörper hat den Vorteil, dass Ki-67 auch in Paraffinschnitten nachweisbar ist (Cattoretti et al. 1992). Neben dem MIB-1 existieren noch zwei weitere Antikörper, der MIB-3, ebenfalls in fast allen Spezies einsetzbar, aber auch ein monoklonaler Antikörper MIB-5 findet Verwendung im Gewebe von Mäusen. Der MIB-1 funktioniert nicht in murinen Geweben, bzw. es kann teilweise zu falsch positiven Reaktionen kommen, daher bestand die Notwendigkeit einen weiteren Antikörper (MIB-5) zu entwickeln (Gerlach et al. 1997; Scholzen et al. 2000). Das Reaktionsprinzip wird im Abschnitt Material und Methoden näher beschrieben.

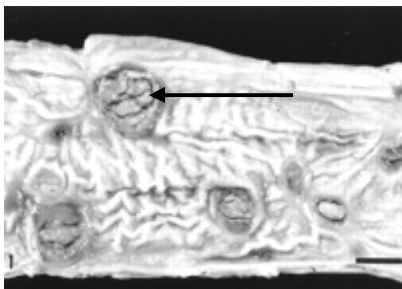
## **Proliferation im Magen-Darm-Trakt**

### Neugeborene

Es ist eine Erkrankung bei Fohlen bekannt, bei der es vor allem in dem Zeitraum 8. – 12. Tag nach der Geburt, in welchem die Stute das erste Mal wieder in die Rosse kommt, zu Durchfällen bei den Neugeborenen kommt, die sogenannte Fohlenrossediarrhoe. Die meisten der erkrankten Fohlen genesen rasch wieder, es kommt jedoch auch immer wieder zu tödlich verlaufenden Durchfallerkrankungen in diesem Zeitraum. Man hat über Jahre hinweg verschiedene Untersuchungen durchgeführt doch keine wirkliche Ursache für diese Erkrankung gefunden. Weder Viren, Bakterien, Parasiten, noch die Fütterung sind als alleinige Faktoren bzw. Auslöser für diese Durchfälle zu sehen. In der durchgeführten Arbeit lässt sich aufgrund dieser Parameter keine Erklärung für diese Erkrankung der Fohlen finden. Die aufkommende Frage ob eventuell die Proliferation der Magen-Darmzellen eine Rolle spielen könnte bleibt unbeantwortet (Wiedemann 1997). Vielleicht ergeben sich anhand der Proliferationsbestimmung im Epithel Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Proliferation und Erkrankung für den sensiblen Zeitraum der Fohlenrosse. Der Magen-Darm-Trakt bei Neugeborenen ist starken Adaptationsprozessen unterworfen. So kann man bei vielen Säugetieren eine starke Zunahme der Gewebsschichten des Magens und einen bemerkenswerten Anstieg der Magensäureproduktion während der frühen postnatalen Periode beobachten. Auch im Darm sind eine Zunahme der Gewebedicke und Modifizierungen des Epithels zu finden. Damit einhergehend ist der Verlust der Fähigkeit, im Dünndarm Makromoleküle zu absorbieren und im Dickdarm Verdauungsenzyme zu produzieren oder Aminosäuren und Glukose zu absorbieren (Xu 1996). Eine neuere Studie zeigt, dass bei intensiver Teilung der Darmepithelzellen und Größenzunahme der intestinalen Zotten im Magen-Darm-Trakt von neugeborenen Kälbern ein gleichzeitiger Abfall der Absorptionsfähigkeit der Darmschleimhaut zu beobachten ist (Roffler et al. 2003).

## Adulte

Die zweite wichtige Erkrankung, vor allem bei adulten Pferden, geht ebenfalls mit einer hohen Proliferation von Darmepithelzellen einher, wobei diese beschriebene abnorme Zellteilung auf neoplastisches Gewebe entfällt, dass sich nach histologischer Untersuchung als Adenom, Lymphom bzw. Lymphosarkom erweist. Bei Darm-Adenomen handelt es sich um fingerförmige Epithelhyperplasien unter Beteiligung fast aller im Darmepithel vorkommenden Zellen, sie können eine Rolle in der Entstehung von Karzinomen spielen. Lymphome bzw. Lymphosarkome erscheinen ebenfalls als Hyperplasie des Epithels, kommen jedoch aus tieferen Schichten und erweisen sich entweder als reine T-Zellneoplasien, B-Zellneoplasien, oder Mischtumoren beider Zelltypen. Auffällig ist bei den betroffenen Pferden dass diese Neoplasien im Darm fast immer mit Kolik, Gewichtsverlust und Durchfällen zusammen auftreten (Hillyer et al. 1997). Ebenfalls Koliken, Diarrhoe und Gewichtsverluste werden in einer anderen Untersuchung beschrieben, von 106 untersuchten Pferden war in 4 % der Fälle die Diagnose Darm-Lymphosarkom (Mair et al. 1997). In zwei weiteren Arbeiten werden solche Neoplasien beschrieben, es wurden ulzerative Veränderungen (siehe Abbildung 3) im Dünndarmbereich beobachtet und von den Umständen die diese Neoplasien begleiten, werden Gemeinsamkeiten zu den in der Humanmedizin vorkommenden Enteropathien mit T-Zell Lymphomen abgeleitet (Herraez et al. 2001; Pinkerton et al. 2002).



**Bild 3:** Dünndarm; Pferd. Ulzerative Läsionen mit neoplastischen Veränderungen (Pfeil). (modifiziert nach: Herraez et al. 2001). Balken = 0,8 cm

### **III. Material und Methoden**

#### **Material / Gewebe**

Die für die Arbeit gewonnenen Gewebeproben wurden ausschließlich von frisch toten Tieren entnommen, dabei betrug der Zeitraum zwischen Exitus letalis und Entnahme der Proben nie mehr als 1 Stunde. Bei den Fohlen, die für die Untersuchung verwendet wurden, handelt es sich um Patienten der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der JLU Giessen, welche aufgrund infauster Prognose euthanasiert wurden oder aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes verstarben. Hierbei handelte es sich nur um Tiere die keine Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes (MDT) aufwiesen. Die Fohlen waren in einem Alter zwischen 6 Stunden und 43 Tagen, siehe auch Tabelle 1 Anhang.

Insgesamt wurden 11 Fohlen und 7 adulte Pferde untersucht. Das Untersuchungsmaterial ist nur schwer zu beschaffen gewesen, da Fohlen in dem für die Untersuchung ausgewählten Lebensalter nur selten in eine Klinik überwiesen werden und es dann aufgrund des hohen materiellen und ideellen Wertes der Fohlen kaum erlaubt wird, Eingriffe vorzunehmen, die in irgendeiner Weise das Fohlen gefährden könnten. Daher ist die Probenmenge auf die oben genannte Anzahl beschränkt, wobei die Sammlung dieser Proben ca. 3 Jahre in Anspruch nahm.

Die Proben der adulten Pferde wurden am Giessener Schlachthof entnommen. Bei diesen Tieren vergingen höchstens 30 Minuten zwischen der Tötung der Tiere und der Entnahme der Proben. Die Entnahme erfolgte bei den Fohlen nach Eröffnung der Bauchhöhle in der Linea alba. Bei den adulten Pferden war der gesamte MDT bereits fachmännisch vom Schlachthofpersonal entnommen und für die Untersuchung bereitgestellt. Der gesamte MDT und die umgebenden Bauchorgane wurden dann auf makroskopische Veränderungen untersucht, erst danach folgte die Eröffnung des Magens und des Darmkanals.

Es wurden stets dieselbe Anzahl von 14 Proben entnommen, welche dann sofort nach der Entnahme in die jeweilige Fixierlösung verbracht wurden.

Aus folgenden Abschnitten wurden Proben entnommen: (siehe Bild 4)

## A. Magen

Fundus (1)

Margo plicatus (2)

Pars nonglandularis (3)

Pylorus (4)

## B. Darm

Duodenum (5)

Jejunum (6)

Ileum (7)

Caput caeci (8)

Corpus caeci (9)

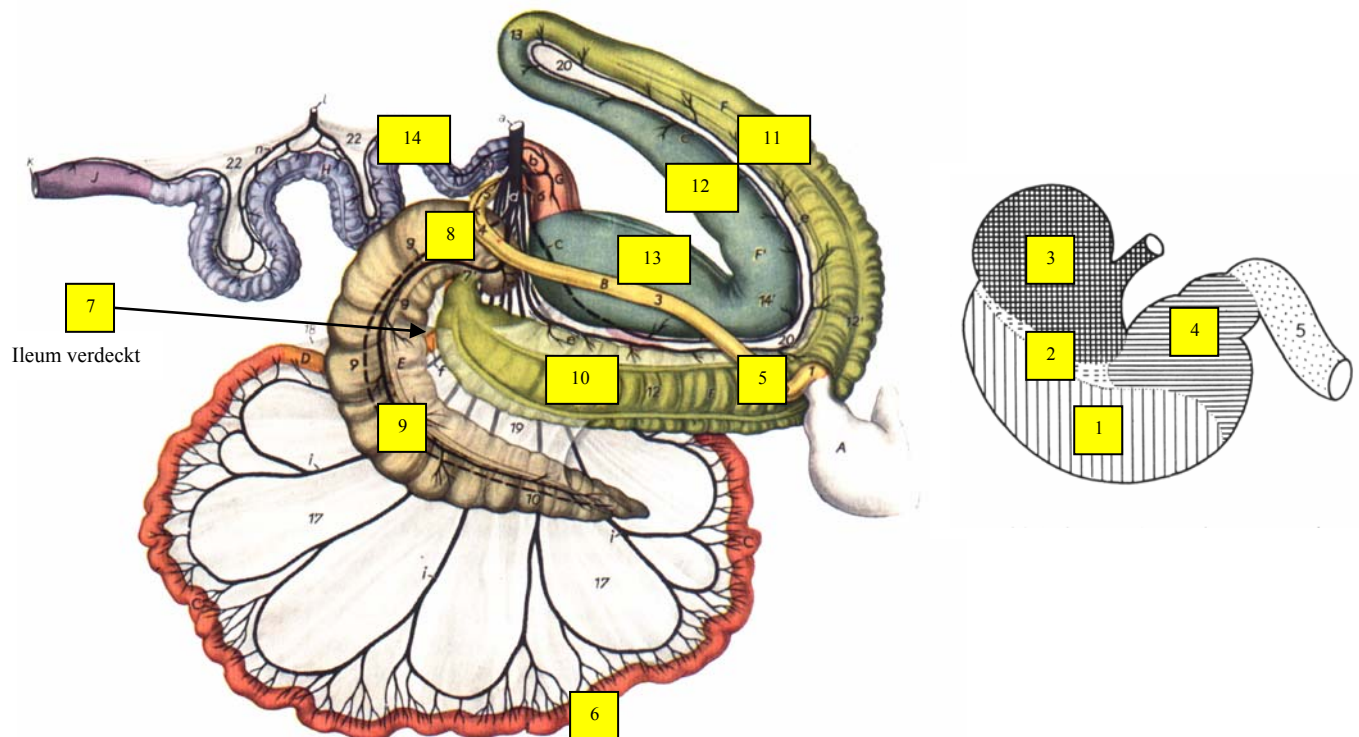
Colon ascendens ventrale dextrum (10)

Colon ascendens ventrale sinistrum (11)

Colon ascendens dorsale sinistrum (12)

Colon ascendens dorsale dextrum (13)

Colon descendens (14)



**Bild 4:** x Entnahmestellen; Darstellungen des MDT (modifiziert nach: Nickel, Schummer, Seiferle, 1987)

Die Größe der Gewebestücke wurde je nach Alter des Tieres (Fohlen / Adult) und weiterer Nutzung (Immunhistochemie / IHC oder Elektronenmikroskopie / EM) so gewählt, dass genügend Material für verschiedene Fixierlösungen zur Verfügung stand. Die verwendeten Fixierlösungen waren:

Bouin'sche Lösung → für spätere IHC / Lichtmikroskopie

Paraformaldehyd nach Lillie → für spätere IHC / Lichtmikroskopie

Für die Immunhistochemie und die darauf folgende Auszählung der Objektträger wurden nach anfänglichen Probedurchgängen nur die mit Paraformaldehyd fixierten Gewebeproben verwendet, da sich die mit Bouin'scher Lösung fixierten Proben später bei der lichtmikroskopischen Auswertung als qualitativ nicht gleichwertig darstellten.

Nach der Entnahme wurden die Proben mit größter Rücksichtnahme auf die Schleimhaut mit Hilfe eines Skalpelles auf einer Wachsplatte in kleinere Stücke geschnitten, wobei die Größe ca. 0,5 x 0,5 cm betrug.

Nach dem Verbringen in die jeweiligen Fixierlösungen wurden die Proben nach einmaligem Austausch der Flüssigkeit für 24 Stunden in der Lösung belassen bis auf die Proben in der Bouin'schen Lösung. Diese wurden schon nach 4 Stunden aus der Fixierlösung entnommen und mit PBS-Puffer gespült.

## **Fixierung der Proben**

### Herstellung der einzelnen Lösungen

#### **Bouin'sche Lösung:**

45 ml Pikrinsäure (Fluka Chemie GmbH; Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

15 ml Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd-Lösung 37%; Merck, Darmstadt)

3 ml Eisessig (Essigsäure 100 % zur Analyse; Merck, Darmstadt)

#### **4% Paraform nach Lillie:**

40 g Paraformaldehyd in 500 ml Aqua bidest. bis zum Siedepunkt erhitzen, dabei mit 1N NaOH klären, dann abkühlen lassen

danach mit 400 ml Aqua bidest. auffüllen

4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  und 6,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (wasserfrei) hinzufügen

die ganze Lösung mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 einstellen und dann auf eine Menge von 1 Liter mit Aqua bidest. auffüllen

Pufferlösungen:

**PBS-Puffer:** für die durchgeführten Versuche mit einem pH-Wert von 7,3

137,0 mM NaCl (Merck, Darmstadt)

2,7 mM KCl (Merck, Darmstadt)

1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt)

8,0 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Darmstadt)

**Zitratpuffer:** für die durchgeführten Versuche mit einem pH-Wert von 6,0

0,1 M Zitronensäure (Citronensäure-Monohydrat, Merck, Darmstadt)

0,1 M Natriumcitrat (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt), beide werden so gemischt dass ein pH-Wert von 6,0 erreicht wird

Nachdem die Proben für 4 (Bouin) bzw. 24 Stunden (Paraformaldehyd) in der Fixierlösung ruhten, wurden sie zuerst dreimal in PBS-Puffer gespült und dann für weitere 24 Stunden in diesem Puffer belassen. Es werden im weiteren die Arbeitsschritte der Gewebeproben für die spätere Lichtmikroskopie bzw. Immunhistochemie beschrieben.

Auf die Pufferspülung erfolgte die Dehydrierung. Nach 2 x 10 min in 50 %igen Alkohol wurden die Proben in 70 %igen Alkohol überführt.

In dem 70 %igen Alkohol verblieben sie dann mehrere Tage unter häufigem Wechseln der Flüssigkeit, vor allem bei den Bouin-Proben wurde darauf geachtet, dass kaum noch eine Gelbfärbung der Flüssigkeit zu beobachten war. Der nächste Schritt war die Einbettung der einzelnen Gewebeproben.

Das Einbetten der Gewebeproben in Paraffin erfolgte in dem Einbettgerät Leica EG 1160 (Leica, Bensheim). Hierbei wurden die Proben in 3 cm x 2 cm x 2 cm große Stahlförmchen verbracht und mit 60°C warmen Paraffin übergossen. Anschließend wurden sie zur Härtung bzw. Abkühlung auf die Kühlplatte des Gerätes gelegt.



## **Beschichtung der Objektträger (OT)**

Vor der Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Glas-OT (SuperFrost-OT; Langenbrinck, Emmendingen) zum Erreichen einer besseren Haftung der Schnitte mit einer Silanelösung beschichtet. Die OT wurden nach folgendem Protokoll mit APTEX (Sigma, Steinheim) behandelt:

OT in Küvettenhalter einsortieren.

OT mit Aqua bidest spülen und befeuchten.

Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen.

OT kurz mit reinem Aceton (Roth, Karlsruhe) spülen und befeuchten.

Aceton unter laufendem Abzug abdampfen lassen, bis OT trocken sind.

OT für 5 Minuten in 2 %iges APTEX (4 ml APTEX auf 196 ml Aceton).

OT für 2 Minuten in Glasbecken mit frischem Leitungswasser stellen.

OT unter fließendem Leitungswasser spülen.

OT für 2 Minuten mit Aqua bidest stellen.

Küvettenhalter auf Unterlage abtropfen lassen.

OT über Nacht bei 37°C in Trockenschrank (Memmert, Schwabach) trocknen.

## **Herstellung von Paraffinschnitten**

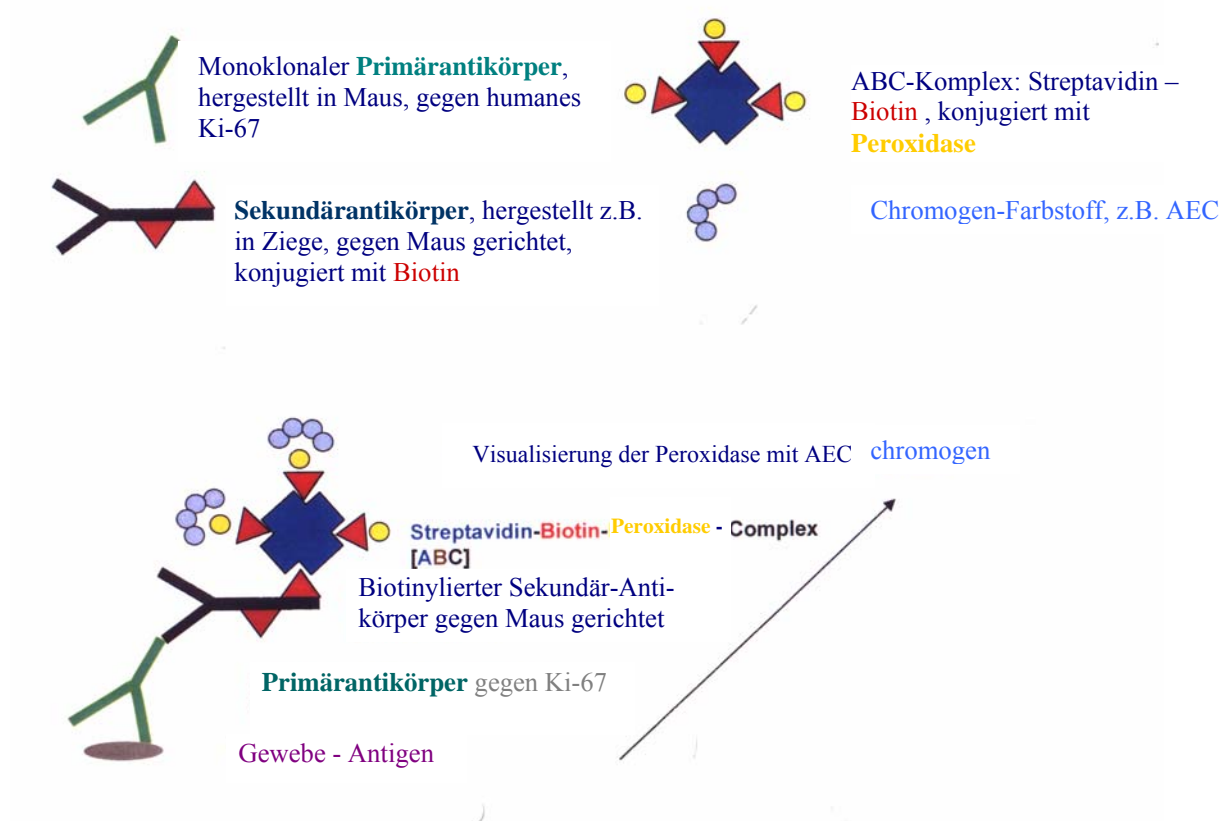
Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mittels Schlittenmikrotom (Leica SM 2000 R; Leica, Bensheim) pro Probe 10 Serienschnitte mit einer Dicke von 5 µm gefertigt und in einem 37°C warmen, mit Aqua dest gefüllten Wasserbad gestreckt. Jeweils zwei aufeinanderfolgende Schnitte wurden dann auf einen mit APTEX beschichteten OT gezogen. Zum Trocknen wurden die Paraffinschnitte über Nacht in einen Trockenschrank bei 37°C verbracht.

## **HE-Färbung**

Um vor Durchführung der Immunhistochemie die Schnitte qualitativ beurteilen zu können wurde vor der IHC von allen ausgewählten Gewebeproben bzw. von jedem ausgesuchten Paraffinblock zunächst ein Hämatoxilin-Eosin-Präparat angefertigt.

## Immunhistochemie

Das Prinzip des Nachweises (Bild 5) beruht auf der Bindung des monoklonalen Antikörpers MIB-1 an dem ausschließlich für die proliferierende Zelle charakteristischen Ki-67-Antigen. Nachdem durch die Erhitzung im Citratpuffer zunächst antigene Vernetzungen gelöst und durch eine Maskierung mit NHS (Normal Horse Serum) unspezifische Bindungen verhindert wurden, kann an den spezifischen Primärantikörper ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper gebunden werden. Als dritte Komponente wird das mit einer Peroxidase konjugierte Glykoprotein Streptavidin hinzugegeben, welches mit Biotin einen Komplex bildet. Diese Bindung wird durch ein peroxidasespezifisches Substrat (Chromogen) mit Hilfe von  $H_2O_2$  und Peroxidase sichtbar gemacht, so dass das Ki-67-Antigen über zwei Antikörperbrücken indirekt durch ein amplifiziertes Signal lokalisiert werden kann.



**Bild 5:** Übersicht über das immunhistochemische Reaktionsprinzip

## Übersicht über die verwendeten Substanzen

### **1. Verwendeter Primärantikörper**

MIB 1 – Ki-67                      DAKO A/S Denmark

Monoclonal Mouse Anti Human Ki-67 Ag

Clone MIB 1   Code N° M 7240

### **2. Verwendeter Sekundärantikörper**

Biotinylated Goat Anti Mouse IgG (H+L) Vector Laboratories USA

Code N° BA 2001

### **3. Verwendetes Serum**

Normal Horse Serum (NHS) H-0146 (SIGMA, Taufkirchen)

### **4. Verwendetes Detektionssystem**

Vector Vectastain ABC-Elite-Kit Standard Vector Laboratories USA

Ansatz und Verdünnung nach Herstellerangabe

### **5. Verwendete Entwicklerlösung**

Peroxidase Substrat AEC E012 Linaris, Wertheim-Bettingen

Ansatz und Verdünnung nach Herstellerangabe

### **6. Verwendete Substanzen zum Gegenfärben**

HE- Färbung

## **Versuchsprotokoll**

Tag 1:

Waschpuffer (Tris-Puffer) herstellen:

24 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt) in 1000 ml Aqua bidest lösen, mit konzentrierter HCl (Merck, Darmstadt) auf pH 7,4 einstellen.

Ein Teil dieser Lösung wird zur späteren Antikörper-Verdünnung zurückbehalten, zu dem anderen Teil werden 8 g NaCl und 385 µl Triton X (Merck, Darmstadt) gegeben und vermischt, dieser Anteil wird nun als Waschpuffer verwendet.

### Citratpuffer herstellen:

Stammlösung A: 21,01 g Citronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt) in 1 l Aqua bidest lösen.

Stammlösung B: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt) in 1 l Aqua bidest lösen.

18 ml Stammlösung A und 82 ml Stammlösung B mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen und mit konzentrierter HCl auf pH 6,0 einstellen.

### a. Gewebevorbehandlung (Entparaffinieren und Rehydrieren) – Alkoholreihe

OT in Küvettenhalter einsortieren.

3 x 10 Minuten Xylol (RT).

1 x 5 Minuten 100 %iger Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten 96 %iger Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten 80 %iger Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten 70 %iger Alkohol (Ethanol).

1 x 5 Minuten Aqua bidest

3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler [IKA-Vibrax-VXR, IKA-Werke, Staufen]).

### b. Desmaskierung der Antikörper-Bindungsstellen mittels Erhitzen in Citratpuffer

OT in Standküvette einsortieren. Ein Glasgefäß mit Citratpuffer (pH 6,0) füllen und dann auf der Heizplatte zum Sieden bringen.

Standküvette in Citratpuffer stellen und 20 Minuten im Citratpuffer kochen. Schnitte danach im Puffer mindestens 30 Minuten abkühlen lassen.

4 x 5 Minuten Waschpuffer

### c. Blockierung endogener Enzymaktivitäten (Endogene Peroxidase)

#### 3 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol-Lösung herstellen:

45 ml Methanol (Merck, Darmstadt) und 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %ig; Merck, Darmstadt) mischen.

Inkubation mit 3 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol-Lösung für 15 Minuten bei RT (Standküvette auf Schüttler).

3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

#### d. Inkubation mit primärem Antikörper

Die Schnitte auf dem OT werden vor der Inkubation mit einem Dako-Pen (DAKO, Hamburg) umkreist.

Es wurde ein „monoclonal Mouse-anti-Human Ki-67 Antigen“-Antikörper der Firma DAKO, Glostrup, Dänemark, Klon MIB 1 Code Nr. M 7240 mit der Verdünnung 1:100 verwendet.

Verdünnung des Antikörpers in Tris-Puffer (ohne NaCl und Triton X)

Inkubation mit Primärantikörper in feuchter Kammer (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande) über Nacht bei 4°C in Kühlschrank.

Auf den jeweils mitgeführten Kontrollschnitten wurde der Primärantikörper durch Tris-Puffer ersetzt.

Tag 2:

#### e. Inkubation mit sekundärem Antikörper

3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

Es wurden biotinylierte Ziege-Anti-Maus Immunglobuline der Firma Vector Laboratories, USA, BA-2001 mit der Verdünnung 1:50 (Verdünnung in Tris-Puffer) unter Zugabe von 190 µl Normal Horse Serum (NHS) verwendet.

Inkubation mit Sekundärantikörper in feuchter Kammer für 30 Minuten bei RT.

3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

Anschließend, d.h. 30 Minuten vor Gebrauch, Streptavidin-Peroxidase Vectastain ABC-Elite-Kit Standard (Vector, Burlingame, USA) nach Angaben des Herstellers ansetzen.

#### f. Inkubation mit Vector Vectastain ABC-Elite Kit Standard (ABC-Kit)

3 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

Inkubation mit ABC-Kit in feuchter Kammer für 45 Minuten bei RT.

#### g. Farbreaktion (Entwicklung mit Peroxidase Substrat AEC, Linaris, Wertheim)

2 x 5 Minuten in Waschpuffer (Standküvette auf Schüttler).

1 x 5 Minuten Aqua dest.

Inkubation mit AEC in feuchter und lichtundurchlässiger Kammer für 15-20 Minuten bei RT.  
Kontrolle der Farbreaktion unter dem Mikroskop, danach Abstoppen der Reaktion durch Abspülen der OT mit Aqua dest

2 x 5 Minuten Aqua dest

Gegenfärben mit Hämatoxylin für 15 Sekunden.

15 Minuten in fließendem Leitungswasser bläuen.

Danach Eindecken der OT mit Glycerolgelatine (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen) und Aufbringen des Deckglases.

Bei jedem Färbedurchgang wurde jeweils ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt und wie im Färbeprotokoll beschrieben behandelt, ausgenommen der Inkubation mit dem primären Antikörper, welcher durch Inkubation mit Tris-Puffer ersetzt wurde. Das Gewebe blieb in allen Fällen vollständig unmarkiert.

### **Quantitative Auswertung von Ki-67**

Zur lichtmikroskopischen Auswertung der angefertigten Präparate wurden nur die mit Paraformaldehyd fixierten Präparate verwendet, da diese eine etwas bessere Anfärbung zeigten als die Bouin-fixierten Schnitte. Die einzelnen Objektträger wurden unter dem Mikroskop (LEICA-Dialux, Wetzlar, Germany) bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgewertet, es wurde außerdem ein Raster (Größe: 240 x 240 µm) verwendet, so dass sich pro zu beurteilendem Schnitt 10 Felder ergaben. Jeder Auszählung wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

Das Raster wurde als Abgrenzung der Tunica mucosa zur Tela submucosa an der Lamina muscularis der Tunica mucosa angelegt, da in dieser Untersuchung nur die Proliferationsvorgänge im Epithel berücksichtigt wurden; Ausnahme hierbei die Schnitte aus dem drüsenhaltigen Teil des Magens, bei diesen wurde der Bereich des Drüsengrundes der Magendrüsen gewählt.

Es wurden stets alle 10 Felder des Rasters ausgezählt, dabei ergab sich im Durchschnitt, je nach Magen- oder Darmabschnitt, eine minimale Anzahl von mindestens 200 Zellkernen und eine maximale Anzahl von 550 Zellkernen pro Raster.

Es wurden jeweils nur die Schnitte beurteilt, bei denen lichtmikroskopisch alle Strukturen zuzuordnen waren, die Zottenspitzen weitestgehend erhalten, sowie keine Faltungen oder ähnliche Beeinträchtigungen der Schleimhaut zu beobachten waren.

Die Felder wurden zufällig ausgewählt.

Der Anteil der rötlich angefärbten, Ki-67-positiven Magenepithel- bzw. Darmepithel-Zellen an der Gesamtzellpopulation wurde dann in Prozent als Ki-67-Index bzw. Proliferationsindex angegeben. Die aufgeführte Methodik wurde bereits in einer Reihe von Publikationen beschrieben (Gelsleichter et al., 1995; Kanter et al., 1995; Ramsay et al., 1995; Karlsson et al., 1996; Straume et al., 2000).

### **Statistische Auswertung**

Insgesamt wurden 220 Objektträger ausgezählt, die den oben angeführten Kriterien entsprachen. Die Datenauswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der JLU Giessen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP / Dynamic, Release 7.0, (Dixon 1993) durchgeführt.

Für die einzelnen Rechenläufe wurden zuvor arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen, jeweils nach Gruppen getrennt, mit dem Programm BMDP1D berechnet.

Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Lokalisationseinflusses auf die Signifikanz wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (mit Messwiederholung im Faktor Lokalisation) mit dem Programm BMDP2V durchgeführt, außerdem wurde das Programm BMDP3D für die Durchführung des t-Tests für unabhängige Stichproben verwendet. Für die Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde folgendes Signifikanzniveau zugrunde gelegt:

$p < 0,001$  hoch signifikant

$p < 0,05$  signifikant

$p > 0,05$  nicht signifikant

## IV. Ergebnisse

### Lichtmikroskopische Befunde

#### Magen

Die einzelnen Lokalisationen im Magen unterscheiden sich signifikant hinsichtlich ihrer Proliferationsrate der Epithelzellen im Vergleich zwischen Fohlen und adulten Pferden. Im Fundus beträgt die Proliferationsrate durchschnittlich ca. 9 % bei den Fohlen und etwa 17 % bei den Adulten. Die Hauptproliferationszone im Fundusdrüsenepithel liegt im Bereich des Isthmus und des Drüsenhalses. Die Ki-67 positiven Zellen sind anhand der lichtmikroskopischen Merkmale nur schwer zu differenzieren. Aufgrund der Lokalisation handelt es sich in diesem Bereich vor allem um Halszellen, Isthmuszellen und - in der Tiefe der Foveolae gastricae – um junge Oberflächenzellen. Aus den Isthmuszellen als wenig bzw. undifferenzierte Epithelzellen, gehen die verschiedenen tiefer gelegenen Drüsenzellen hervor. Das heißt, sie differenzieren sich zu Haupt-, Neben- und Belegzellen in den Glandulae gastricae propriae und zu den Pylorusdrüsenzellen in den Glandulae gastricae pyloricae. Weiterhin differenzieren sich die Isthmuszellen zu den Oberflächenepithelzellen der Foveolae gastricae.

Gleiche Verhältnisse bezüglich der Proliferationsrate finden sich in der Pars pylorica und im Bereich des Margo plicatus. Bei den Fohlen ergibt sich im Pylorus ein Anteil von ca. 11 % proliferierende Zellen, bei den Adulten etwa 21 %. Die meisten der sich teilenden Epithelzellen sind im Bereich des Isthmus zu finden. Der Margo plicatus als deutliche Abgrenzung zwischen Pars glandularis und Pars nonglandularis des Magenepithels enthält bei den Fohlen einen Anteil von 20 % proliferierender Zellen und 33 % bei den Adulten. Hier ist die Lokalisation der proliferierenden Zellen abhängig von der charakteristischen Zweiteilung des Margo plicatus, nämlich der Pars glandularis und der Pars nonglandularis. Im Pars nonglandularis befinden sich die mitotisch aktiven Zellen fast ausschließlich im Stratum basale, weit distal der Epitheloberfläche. Nur vereinzelt finden sich bei den Adulten, im Gegensatz zu den Fohlen, proliferierende Zellen auch noch im Stratum spinosum. Keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proliferationsrate sind im Bereich des Pars nonglandularis zu erkennen (siehe Abb.1 – 6).

Vergleicht man die Einzellokalisationen im Magen weisen Fohlen im Durchschnitt einen geringeren Proliferationsindex auf als Adulte (siehe Abb.11).



## Darm

Im Dünndarm ergeben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsrate bei dem Vergleich der Einzellokalisationen (siehe Abb.12). Die durchschnittliche Proliferationsrate für den Dünndarm liegt bei den Fohlen bei 31,22 % und bei den Adulten bei 31,88 %. Auffällig ist das Verteilungsmuster der teilungsaktiven Zellen, der größte Anteil ist im Bereich der Krypten der Glandulae intestinales lokalisiert. Innerhalb der Krypten kann man die Hauptproliferationszone im oberen Drittel der Krypten lokalisieren. Vereinzelt sind auch proliferierende Zellen in der Zottenspitze und innerhalb der aufsteigenden Zotte zu erkennen.

Der Dickdarm zeigt bezüglich der Proliferation der Epithelzellen in seiner Gesamtheit ein ähnliches Verteilungsmuster wie der Dünndarm. Es sind hinsichtlich der Proliferationsrate keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzellokalisationen zu finden (siehe Abb.13). Die durchschnittliche Proliferationsrate für den Dickdarm beträgt für die Fohlen 24,20 % und für die Adulten 24,99 %. Die sich teilenden Zellen sind zum größten Teil ebenfalls in den Krypten lokalisiert, hier im unteren Drittel der Krypten. Man erkennt im histologischen Präparat viele für den Dickdarm typische Becherzellen, deren Ki-67 positive Kerne stark an den Rand gedrängt sind. Außer den Becherzellen sind es vor allem die undifferenzierten Epithelzellen der Krypten die den Hauptanteil der mitotisch aktiven Zellen ausmachen, sie dienen der ständigen Erneuerung der oberflächlich zum Lumen hin abgeschilferten Epithelzellen (siehe Abb. 7 – 10).

Vergleicht man den Magen, den Dünndarm und den Dickdarm in ihrer Gesamtheit und unabhängig von der Altersgruppe (Fohlen, Adulte) so ergeben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des Proliferationsindex. Demnach proliferiert das Dünndarmepithel stärker als das Dickdarmepithel und dieses stärker als das Magenepithel (siehe Abb.14).

Die folgenden Abbildungen zeigen die Verteilungsmuster und Lokalisationen der Ki-67 positiven Zellen in den einzelnen Abschnitten des MDT von Fohlen und adulten Pferden. Die Ki-67 positiven Zellen sind erkennbar an der roten nukleären Färbung.

Im Fundus des Magens zeigen sich deutlich angefärbte Ki-67 positive Zellen. Auffallend ist hierbei, dass zum einen der Hauptanteil der sich teilenden Zellen im Bereich des Isthmus der Fundusdrüsen liegt, zum anderen der Anteil dieser Zellen beim Fohlen schon in der Übersicht kleiner erscheint als bei den Adulten.

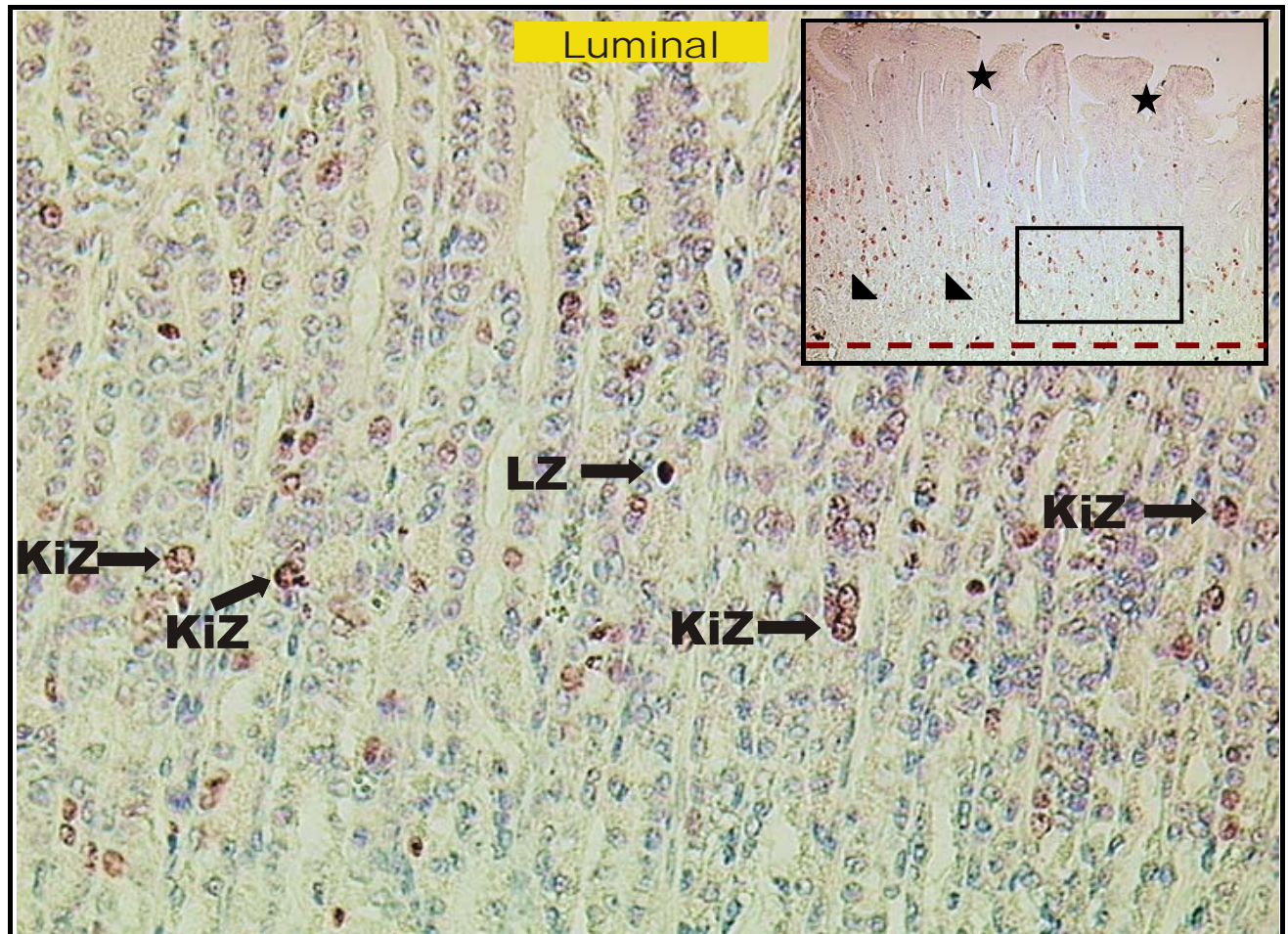


Abb.1: Ausschnitt aus der Fundusdrüsen Schleimhaut eines Fohlens (F 11) 200fach; LZ: Lymphozyt; KiZ: Ki-67 positiver Zellkern; ★ Foveolae gastricae; ▲ Glandulae gastricae propriae

Insert: Übersicht über den in Abbildung 1 gezeigten Isthmusbereich der Mageneigendrüsen (100fach), eine Häufung der proliferierenden Zellen im Isthmusbereich ist deutlich zu erkennen; die gestrichelte Linie im Insert markiert die Lamina muscularis mucosae

Die bei den Auszählungen anhand ihrer Morphologie erkannten Lymphozyten wurden nicht mitgezählt, sie werden ebenfalls durch die Ki-67-Immunhistochemie rot angefärbt. Der Verlauf der Glandulae gastricae propriae sowie deren Lumen ist gut zu erkennen.



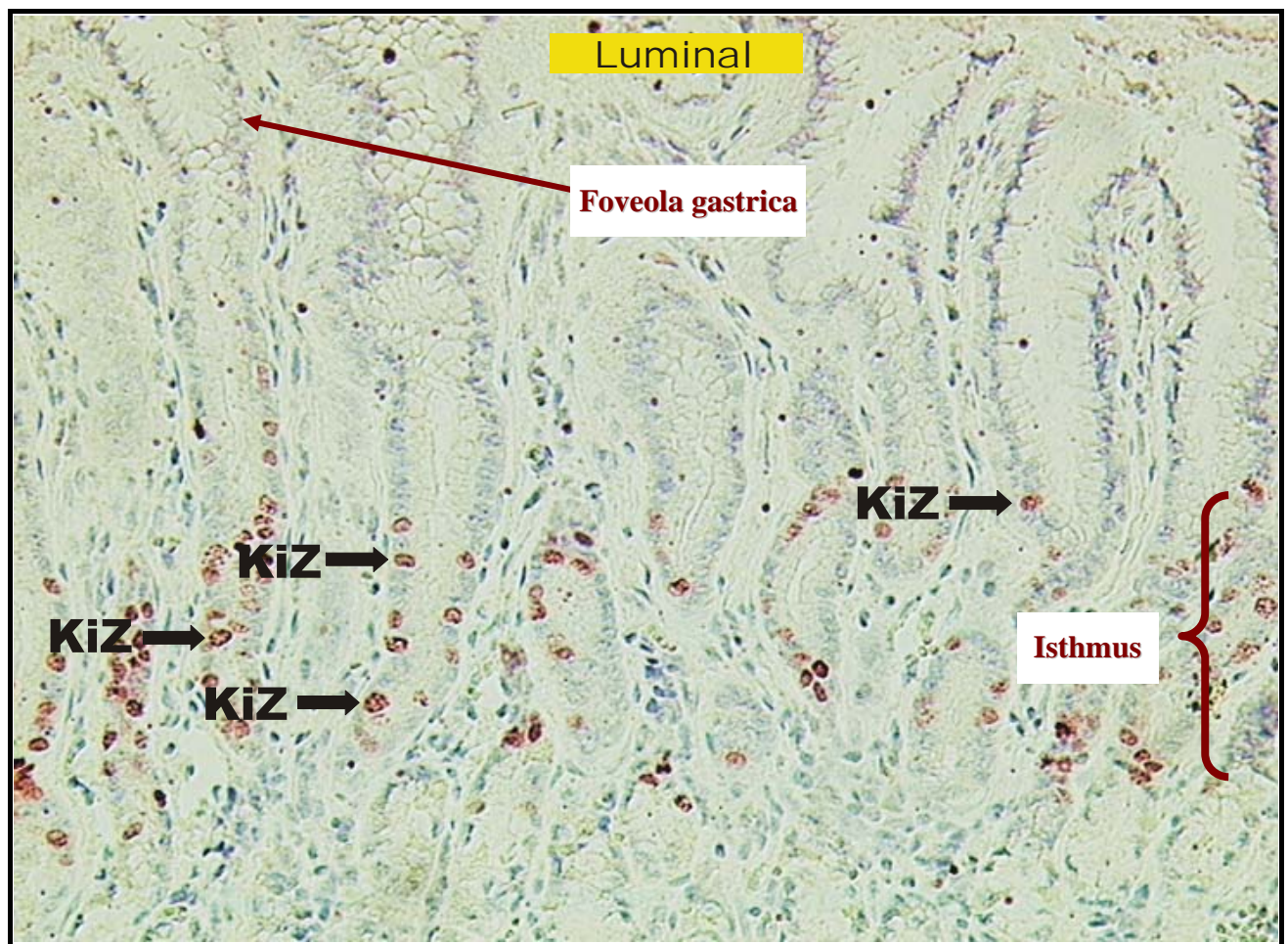


Abb.2: Ausschnitt aus der Fundusdrüsen Schleimhaut eines adulten Pferdes 200fach;  
 KiZ: Ki-67 positiver Zellkern

Die gleichen Verteilungsmuster der Epithelzellen zeigen sich auch beim adulten Magen, vorherrschend sind die sich teilenden Zellen im Isthmusbereich der Fundusdrüsen zu finden. Die darunter liegende Lamina muscularis als Abgrenzung zur Tela submucosa ist hier bei dieser Vergrößerung nicht zu sehen.

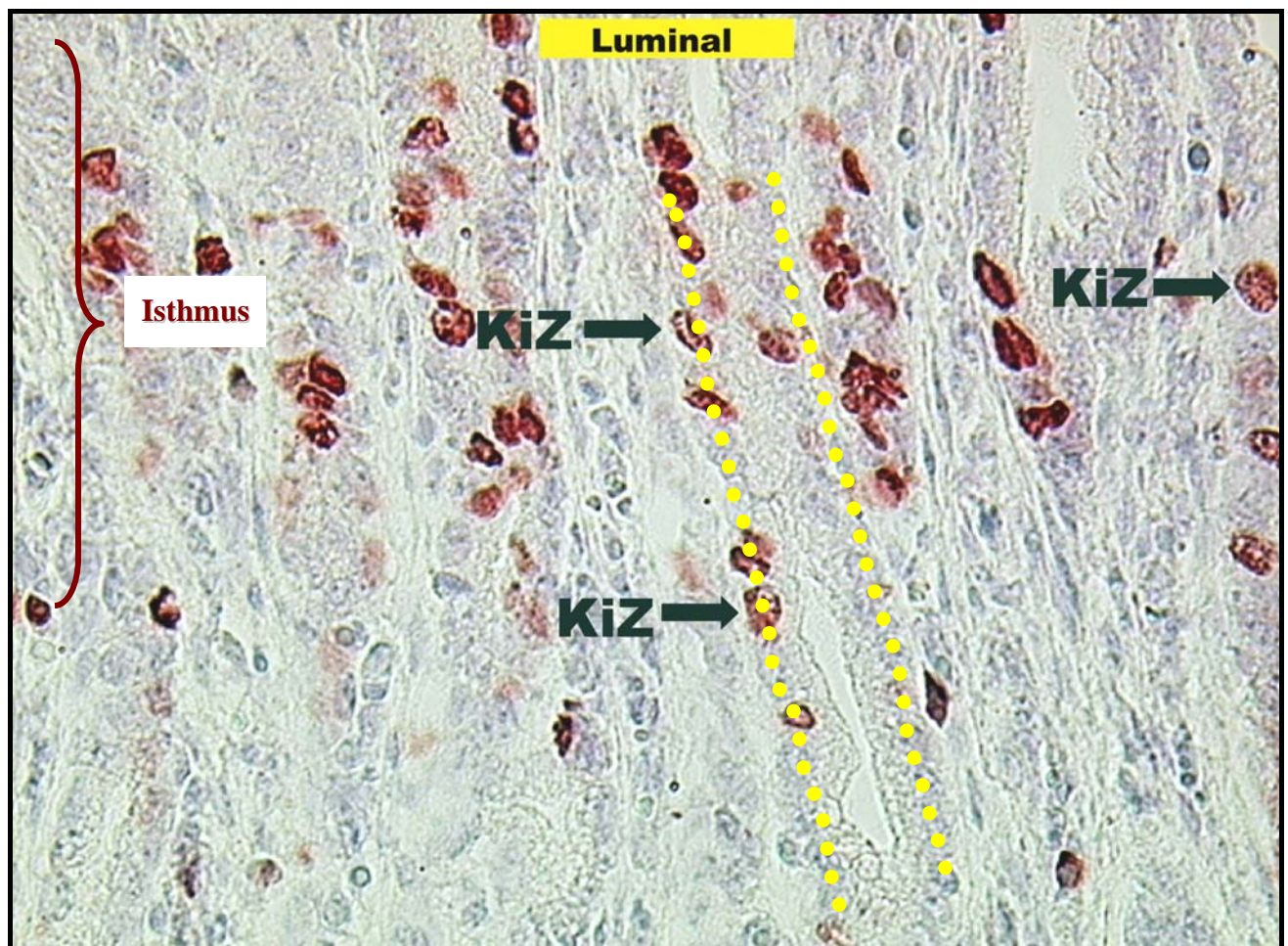


Abb.3: Ausschnitt aus der Pylorusdrüsen Schleimhaut eines Fohlens (F 9) 400fach; KiZ: Ki-67 positiver Zellkern; gelbe gepunktete Linie zeigt den Umriss einer Pylorusdrüse

Das obige Bild zeigt deutlich die Häufung der Ki-67 positiven Zellen im Isthmus der Glandulae gastricae pyloricae.



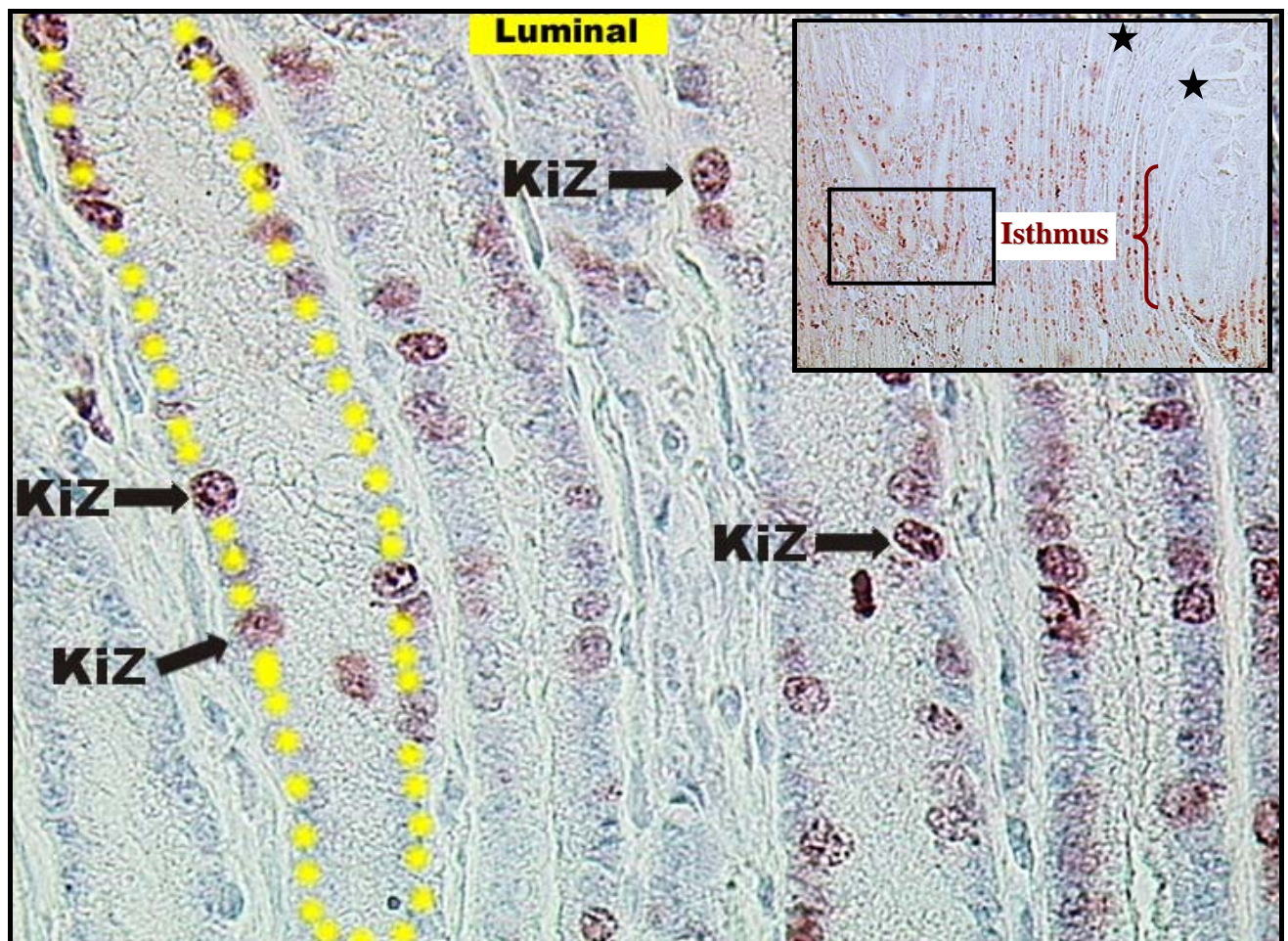


Abb.4: Ausschnitt aus der Pylorusdrüsen Schleimhaut eines adulten Pferdes 400fach;  
 KiZ: Ki-67 positiver Zellkern; gelbe gepunktete Linie zeigt den Umriss einer Pylorusdrüse; ★ Foveolae gastricae  
 Insert: Übersicht über einen dem in Abb. 4 gezeigten benachbarten Magenabschnitt (Pylorus 100fach) mit gekennzeichneten Foveolae gastricae und Isthmusbereich



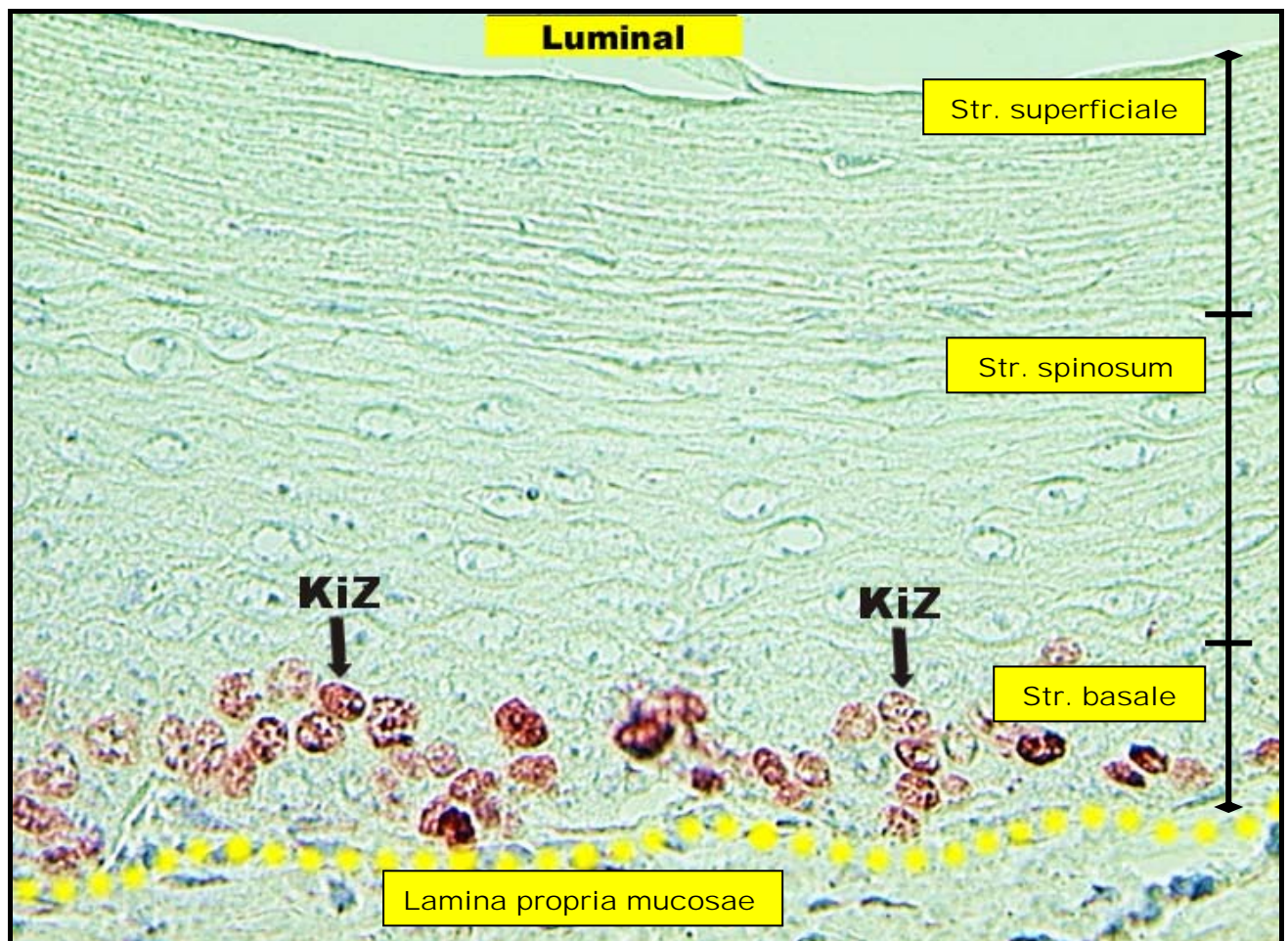


Abb.5: Schleimhaut der Pars nonglandularis des Magens eines Fohlens (F 7) 400fach; KiZ: Ki-67 positiver Zellkern; gelbe gepunktete Linie gibt die Basalmembran als Grenze zur Lamina propria mucosae an

In der Pars nonglandularis des Magens liegt das Epithel in Form einer kutanen Schleimhaut vor, die Ki-67 positiven Zellen konzentrieren sich auf das Stratum basale.

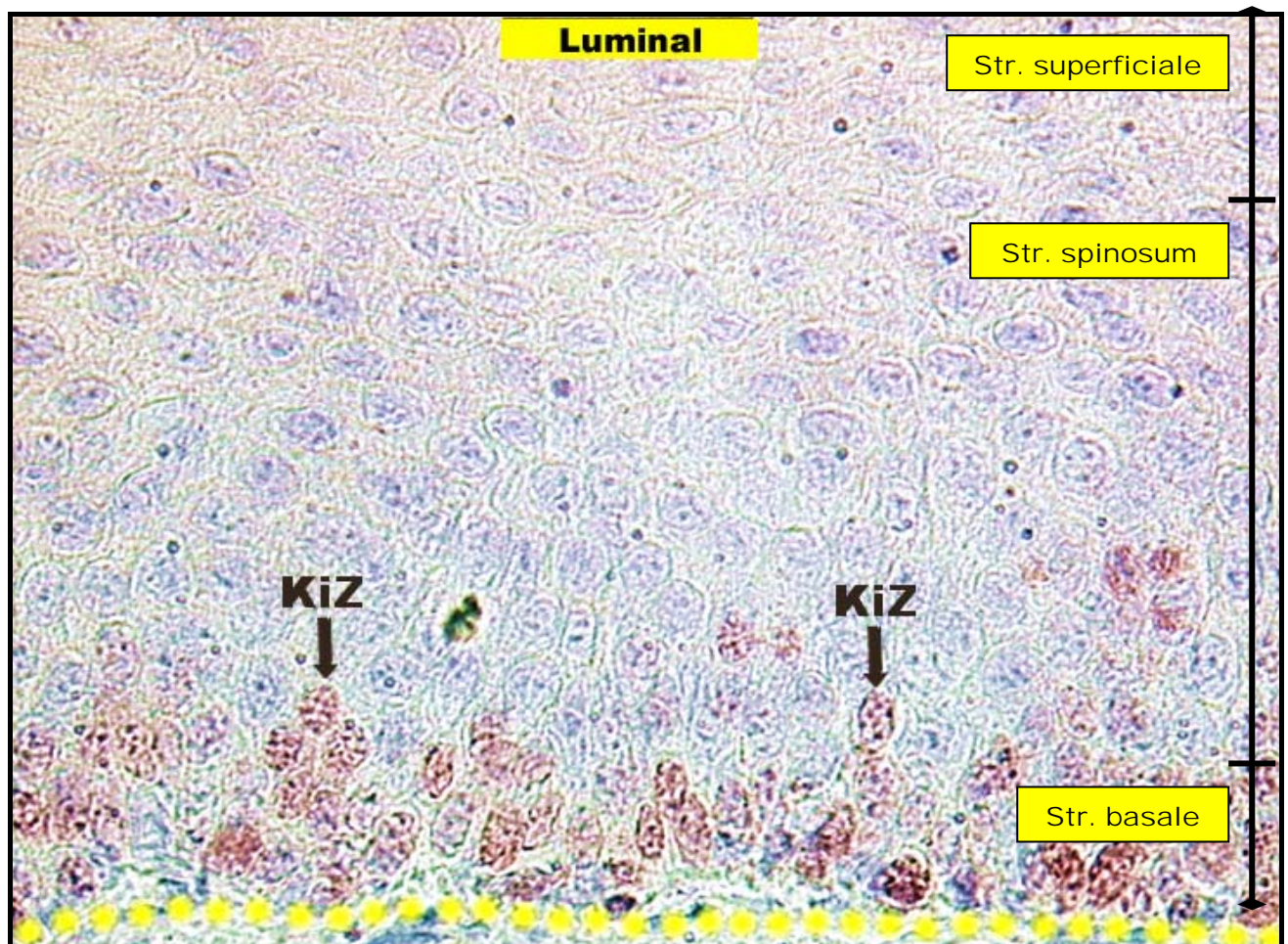


Abb.6: Ausschnitt aus der Pars nonglandularis des Magen eines adulten Pferdes 400fach;  
 KiZ: Ki-67 positiver Zellkern; gelbe gepunktete Linie gibt die Grenze zur Lamina  
 propria mucosae an

Auch beim adulten Pferd konzentrieren sich Ki-67 positive Epithelzellen ausschließlich im  
 Stratum basale.



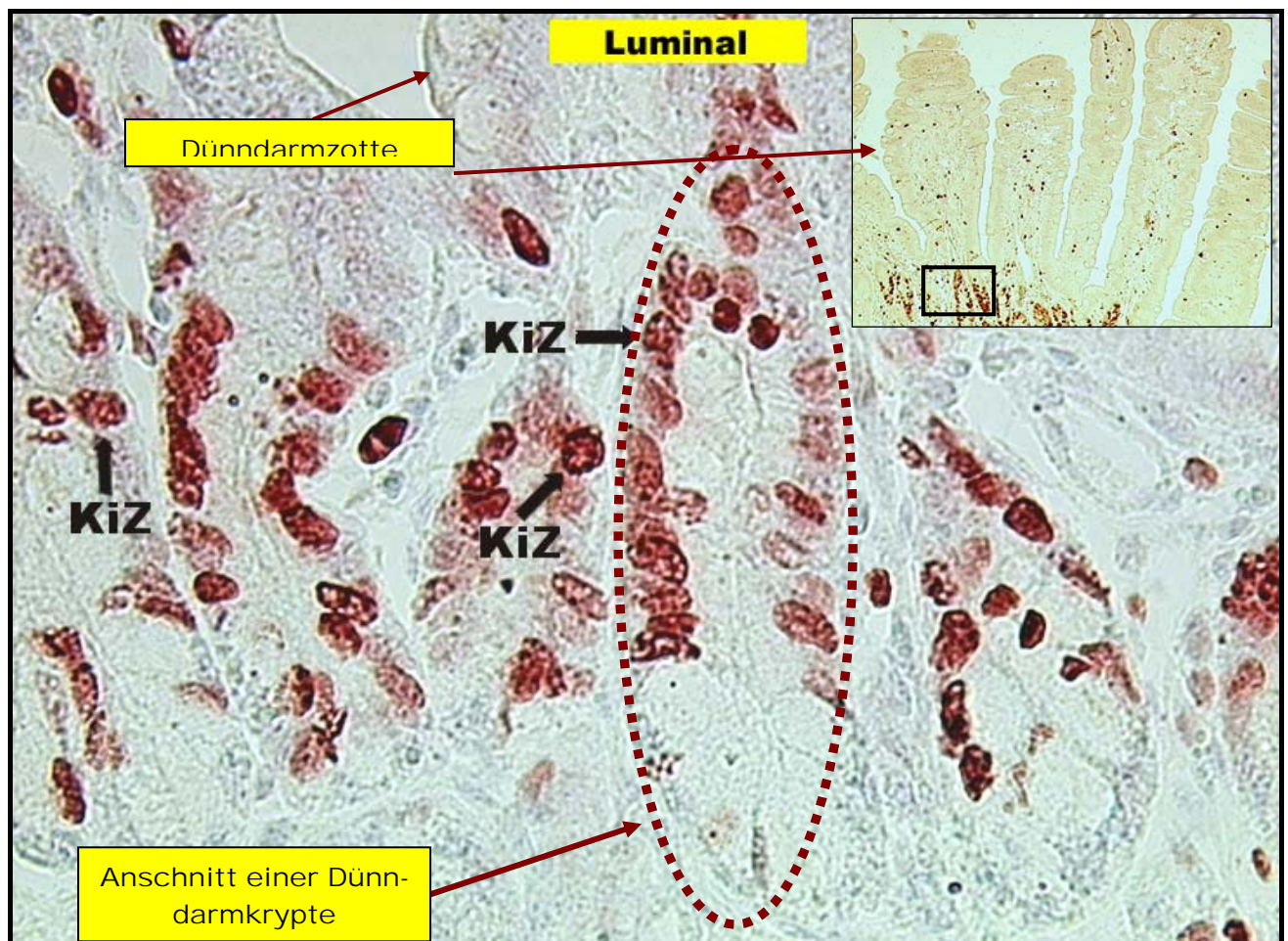


Abb.7: Ausschnitt aus dem Dünndarmepithel eines Fohlens (F 10) – Jejunum 400fach;  
 KiZ: Ki-67 positiver Zellkern  
 Insert: Übersicht über einen dem in Abbildung 7 gezeigten benachbarten Dünndarm-  
 abschnitt (Jejunum, 100fach), Dünndarmzotten und Krypten sind deutlich zu  
 erkennen



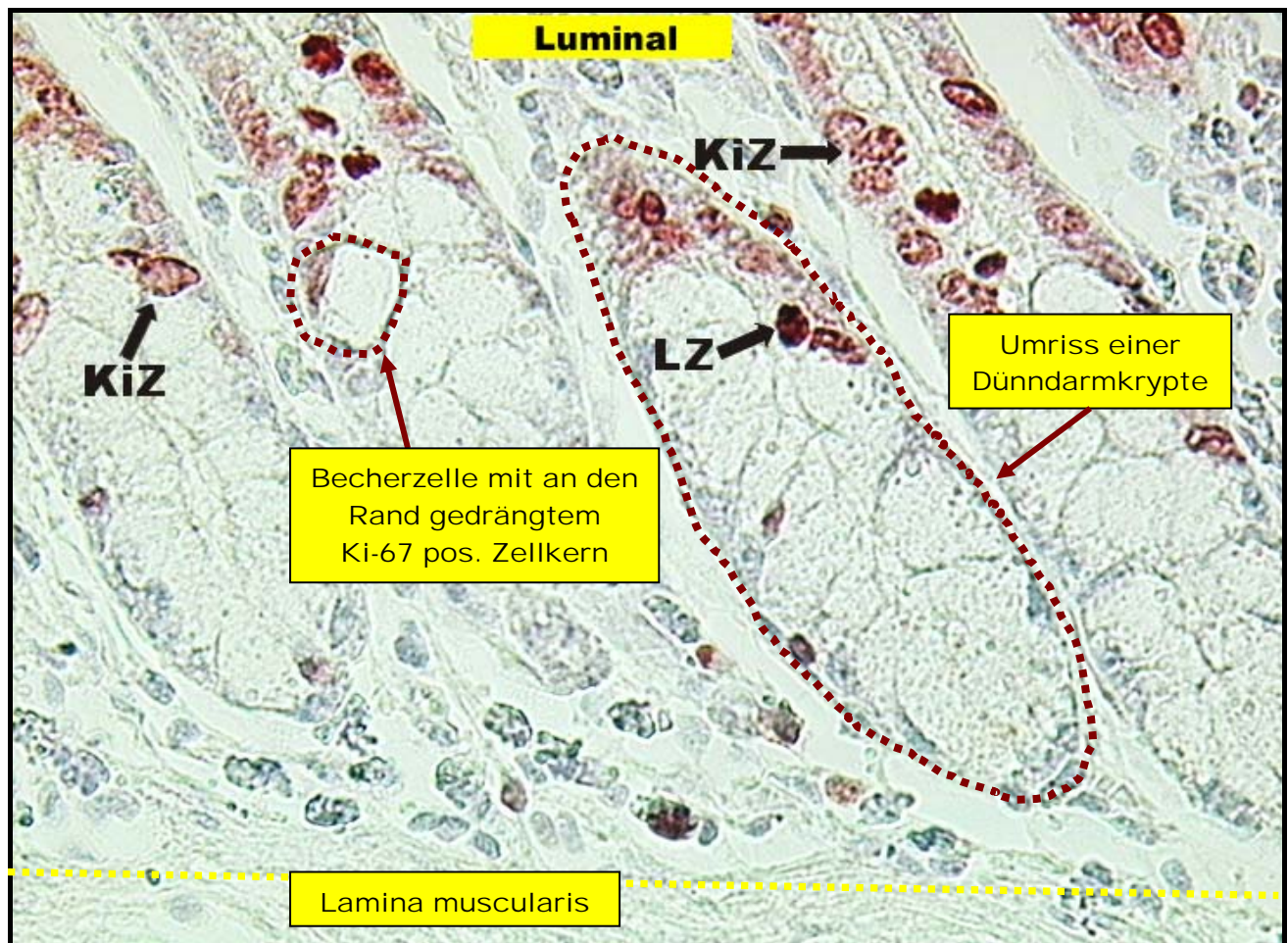


Abb.8: Ausschnitt aus dem Dünndarmepithel eines Adulten – Jejunum 400fach; KiZ: Ki-67 positiver Zellkern; LZ: Lymphozyt; gelbe gepunktete Linie gibt die Abgrenzung zur Lamina muscularis mucosae an

Bei den Abbildungen (Abb. 7 und 8) wird deutlich, dass die Mehrheit der proliferierenden Zellen im Bereich der Krypten des Darmepithels anzutreffen ist. Außerdem kann man erkennen, dass oft mehrere Krypten zu einer oberflächlich hervortretenden Zotte gehören. Bei den in den Krypten ansässigen Becherzellen ist der Zellkern durch das mit Mukus gefüllte Zellplasma völlig an den Rand der Zelle gedrängt. Die meisten der hier Ki-67 positiven Zellen im Kryptenbereich sind undifferenzierte Epithelzellen und dienen der Erneuerung der lumenwärts abgeschilferten Zellen an der Zottenspitze. Neben den Kernen der Becherzellen sind auch rötlich angefärbte, positive Kerne von Enterozyten (Saumzellen) zu erkennen.

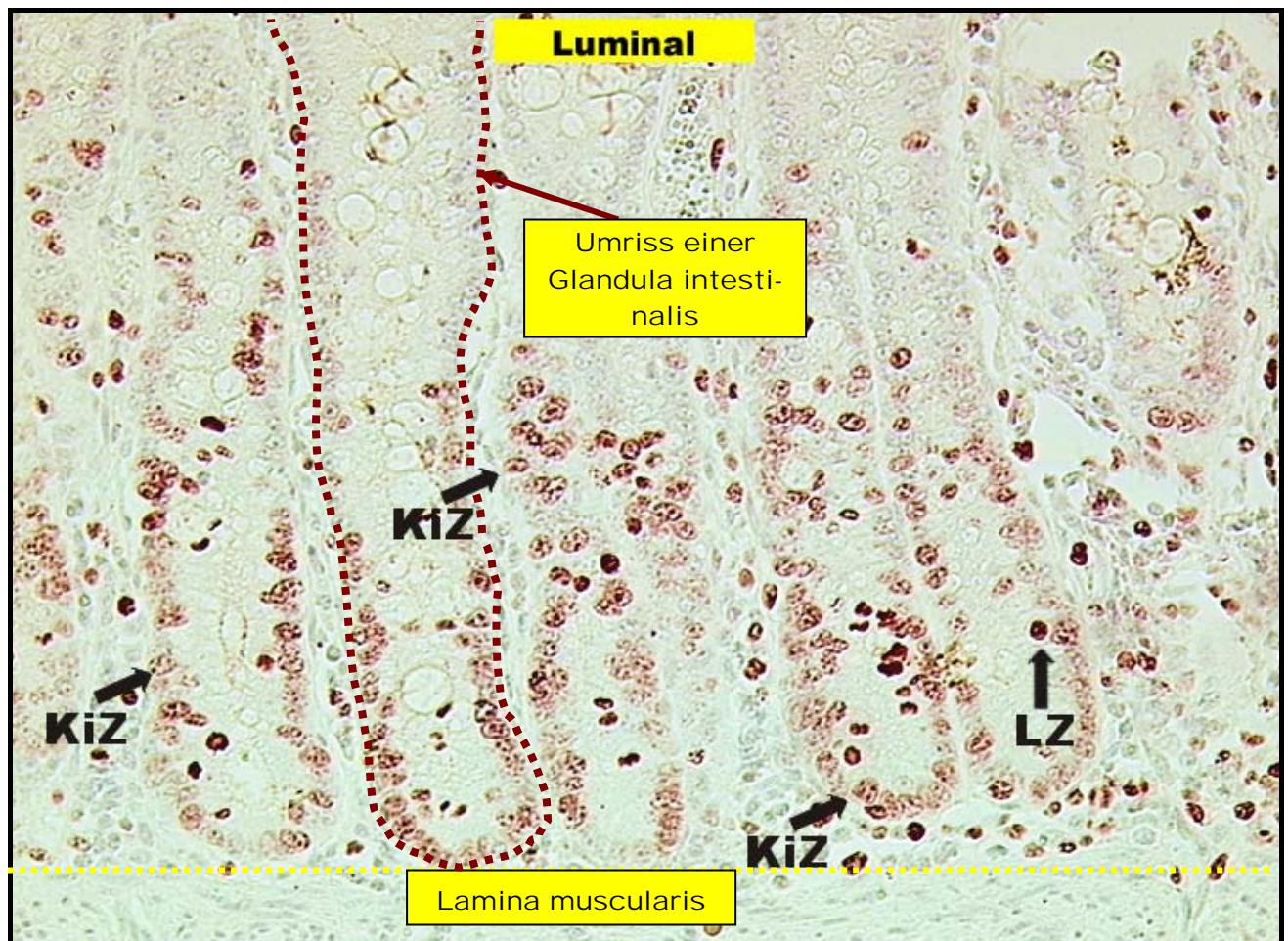


Abb.9: Ausschnitt aus dem Dickdarmepithel; Colon 200fach eines Fohlens (F 11); KiZ: Ki-67 positiver Zellkern; LZ: Lymphozyt; gelbe gepunktete Linie gibt die Abgrenzung zur Lamina muscularis an

Während der Hauptanteil der proliferierenden Epithelzellen im Dünndarm noch im oberen Drittel der Krypten verteilt ist, stellt sich im Dickdarm umso deutlicher heraus, dass vor allem im unteren Drittel der Glandulae intestinales die mitotisch aktiven Zellen vorherrschen.



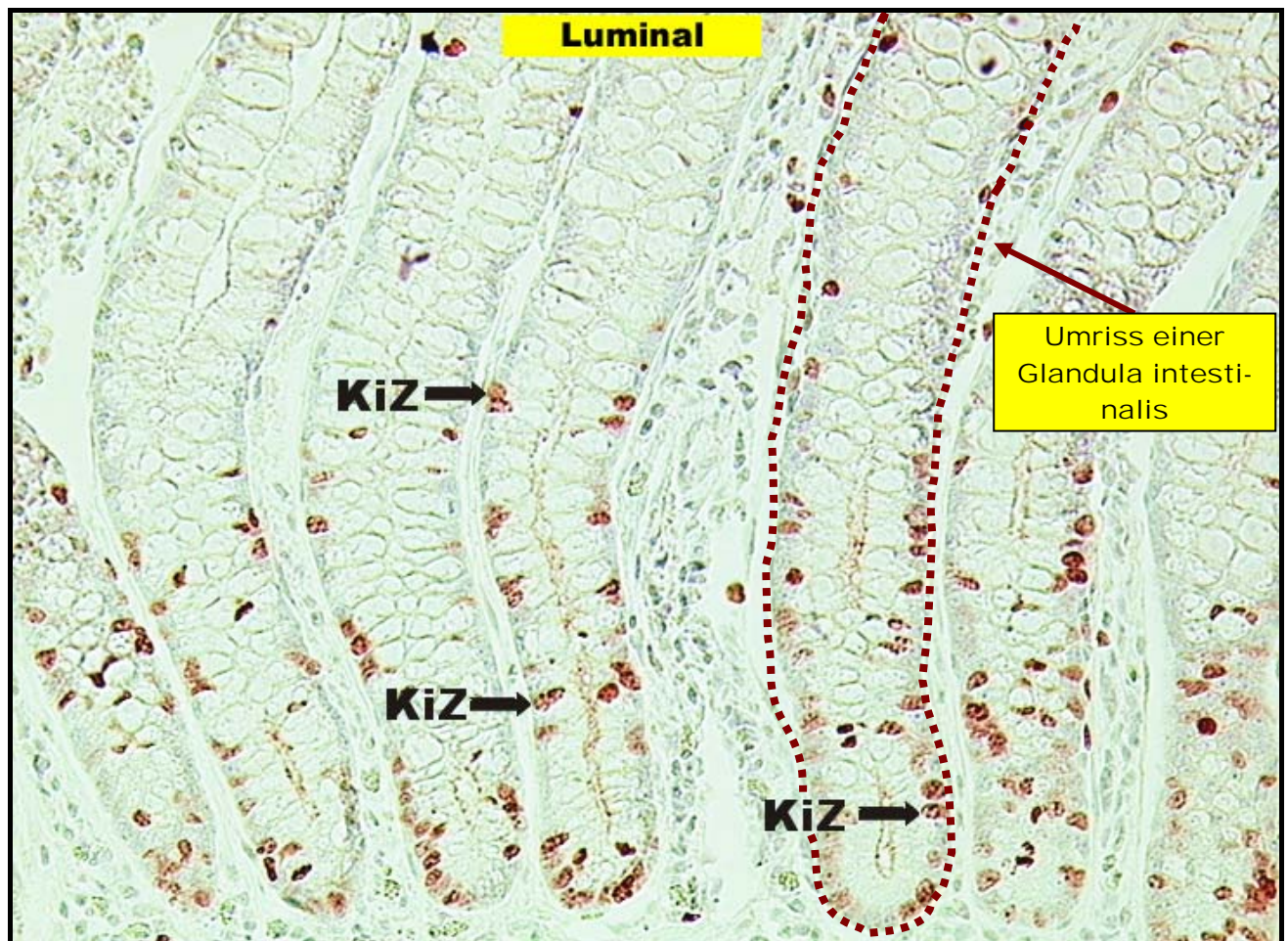


Abb.10: Ausschnitt aus dem Dickdarmepithel; Colon 200fach eines Adulten; KiZ: Ki-67 positiver Zellkern

Wie schon weiter oben angesprochen ist auch auf dieser Abbildung zu erkennen, dass sich die teilenden Zellen vor allem im unteren Drittel der Dickdarmkrypten anfinden.

## **Auszählung und Statistik**

Um die Frage nach Unterschieden zwischen den verschiedenen Organen, Magen und Darm, deren Abschnitten und den beiden Altersgruppen Fohlen – adulte Pferde in der Proliferation zu beantworten, wurden die Zählergebnisse der immunhistochemischen Färbung tabellarisch erfasst (Tabellen siehe Anhang) und dann statistisch ausgewertet.

Bei der Auswertung wurde zum einen untersucht, ob sich Unterschiede zwischen den zwei Gruppen (Fohlen / Adulte) bezüglich der Größe des Proliferationsindex ergeben, zum anderen, ob sich die einzelnen Lokalisationen im Magen-Darm-Trakt voneinander unterscheiden. Daraus ergibt sich im Magen eine insgesamt geringere Proliferationsrate bei den Fohlen im Vergleich zu den adulten Pferden. Im Dünndarm und im Dickdarm ergeben sich auffällig gleiche Werte bei dem Vergleich beider Altersgruppen. Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils die verschiedenen Abschnitte des MDT im Vergleich untereinander, bezüglich des Anteils der Ki-67 positiven Zellen an der Gesamtpopulation, angegeben als Proliferationsindex in Prozent (%).

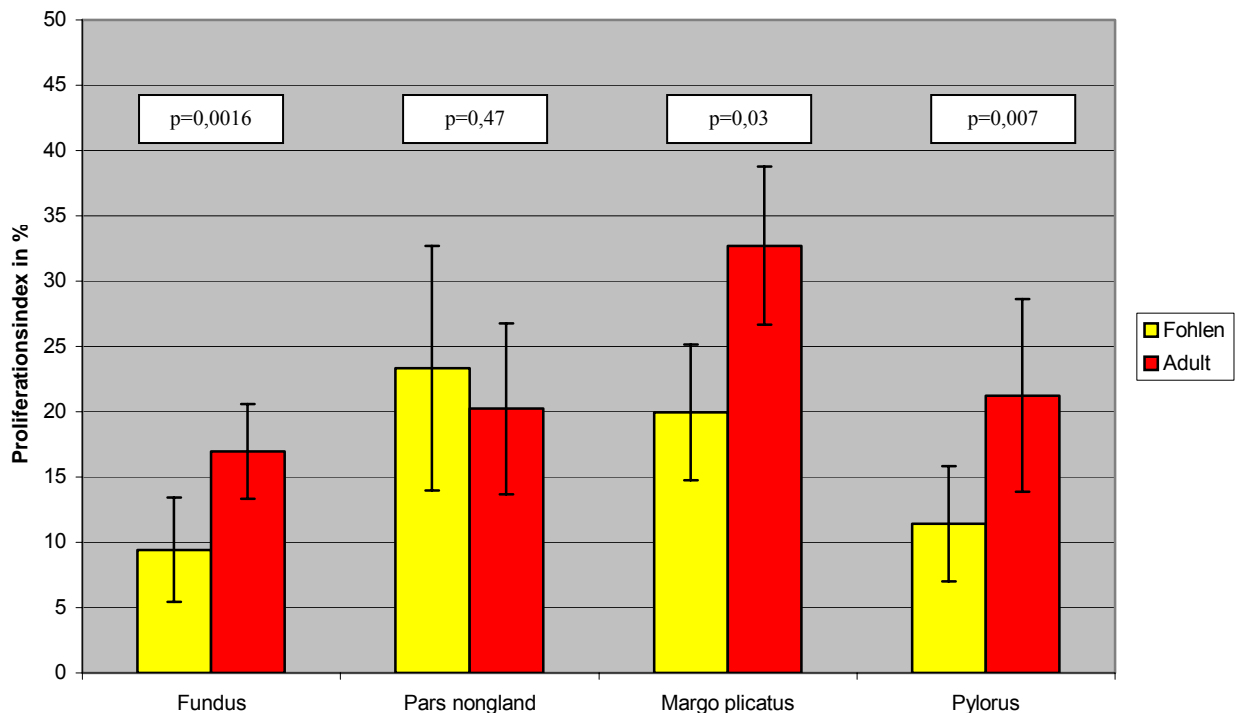


Abb.11: Proliferation in den einzelnen Abschnitten des **Magens** – Mittelwerte;  
p-Werte nach Durchführung des t-Tests für unabhängige Stichproben

In dem Diagramm (Abb.11) zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Lokalisationen im Magen bezüglich der Proliferation der Magenepithelzellen. So ergibt sich für den Fundus eine durchschnittliche Proliferationsrate von 9,43 %, das bedeutet, gemessen an der Gesamtpopulation der Magenepithelzellen sind nur diese Zellen im Teilungsprozess. Sie exprimieren somit das Ki-67 Antigen und werden durch den MIB-1 Antikörper detektiert und durch die Enzymreaktion gefärbt. Die gefärbten Nuclei der Epithelzellen erscheinen rot bis rotbraun.

Bei adulten Pferden ergibt sich ein Proliferationsindex (Pi) von 16,95 % im Fundusdrüsenepithel, also eine deutlich höhere Mitoserate als bei den Fohlen ( $p=0,0016$ ). Für die Pars nonglandularis ergeben sich keine signifikanten Unterschiede, hier liegt der Pi bei den Fohlen mit 23,34 % höher als der Pi der adulten Pferde mit 20,24 %. Betrachtet man die Verhältnisse im Margo plicatus und im Pylorus des Magenepithels so ergeben sich beim Fohlen 19,96 % und 11,42 %, adulte Pferde weisen dagegen signifikant höhere Werte auf. Für den Margo plicatus wurde hier ein Pi von 32,72 % und für den Pylorus 21,25 % errechnet.

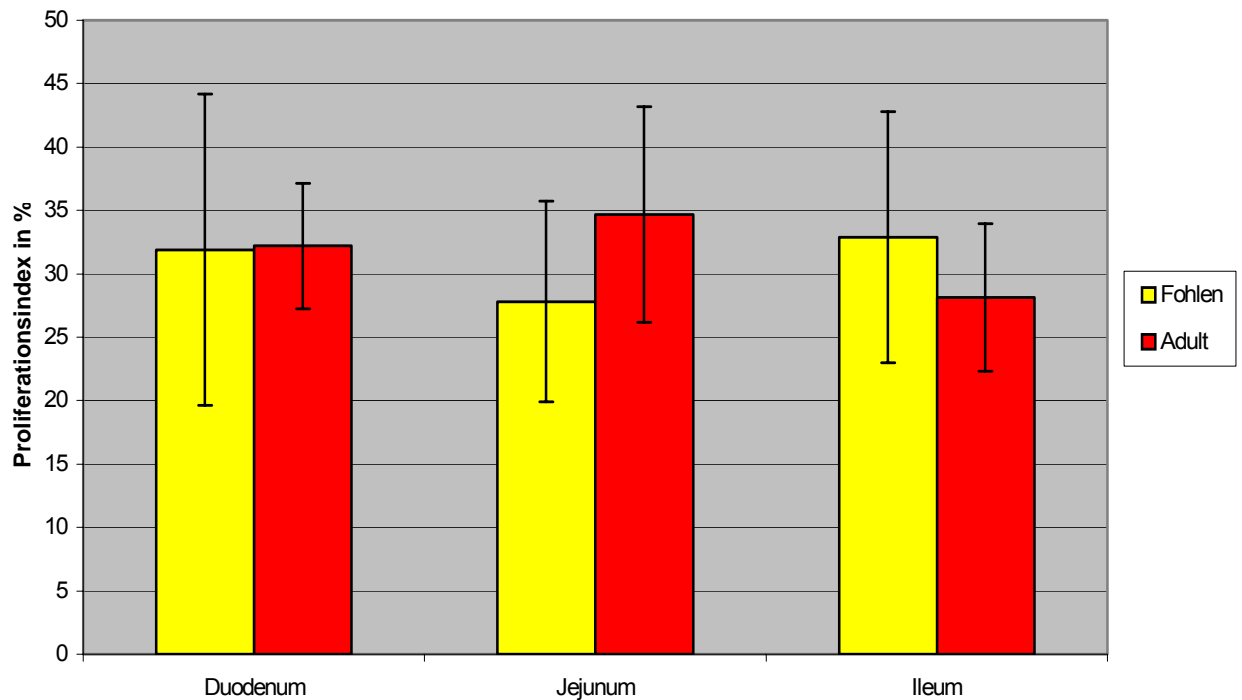


Abb.12: Proliferation in den einzelnen Abschnitten des **Dünndarmes** - Mittelwerte

In Abbildung 12 sind die Unterschiede der Pi's zwischen den einzelnen Lokalisationen des Dünndarms im Vergleich zum Magen nicht mehr gegeben, da die Proliferationsindices sich angleichen. Fohlen und adulte Pferde liegen mit einem Pi von 31,89 % und 32,19 % im Duodenum eng zusammen. Auch bei Jejunum und Ileum ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Pi im Jejunum beträgt 27,82 % bei Fohlen, 34,68 % bei Adulten und im Ileum 32,89 % bei Fohlen und 28,13 % bei adulten Pferden.

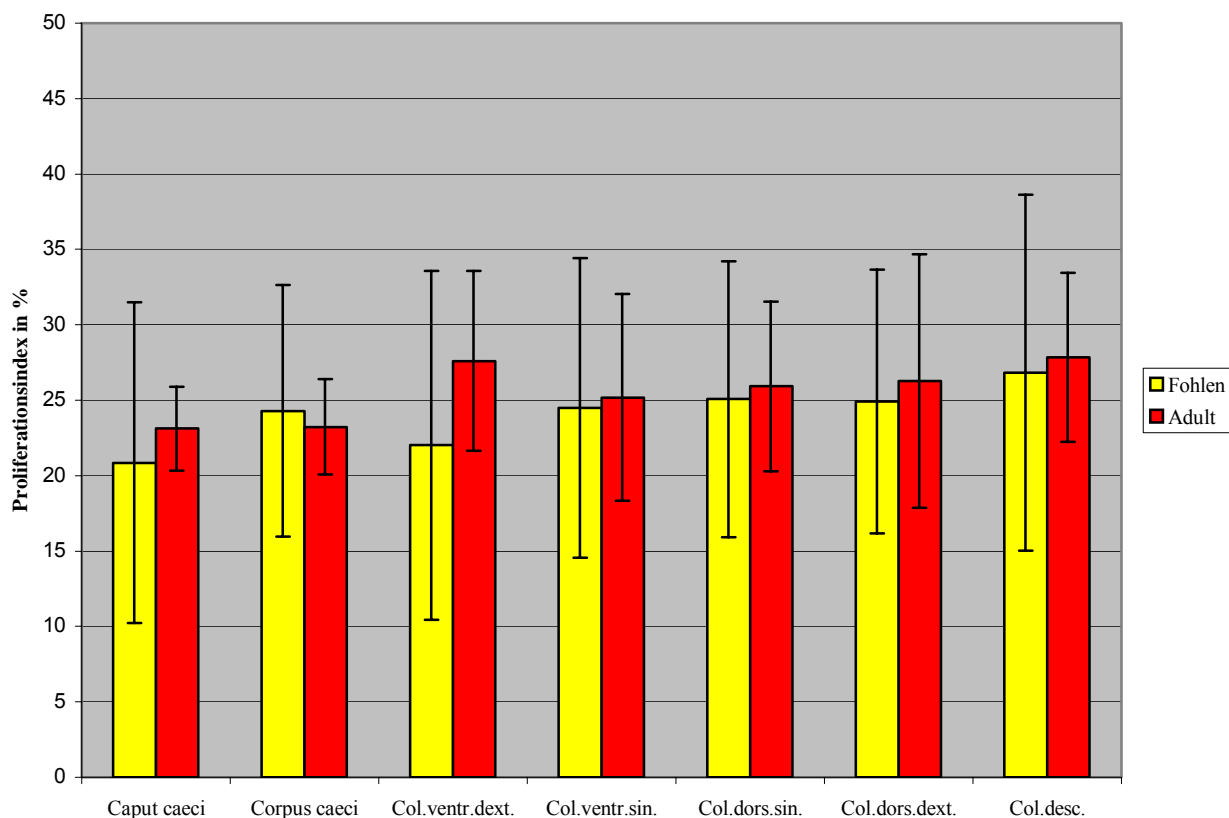


Abb. 13: Proliferation in den einzelnen Abschnitten des **Dickdarmes** – Mittelwerte

Abbildung 13 zeigt noch deutlicher dass die Proliferation in den Einzellokalisationen des Dickdarmes bei Fohlen und Adulten weitestgehend gleich ist. Betrachtet man die Werte (siehe auch Anhang) so sieht man wie nah im Einzelfall die Anteile der proliferierenden Zellen, im Vergleich Fohlen zu Adult, beieinander liegen. Die einzelnen Proliferationsindices sind in der unten stehenden Tabelle angegeben.

	Caput caeci	Corpus caeci	Colon ventr.dext.	Colon ventr.sin.	Colon dors.sin.	Colon dors.dext.	Colon desc.
Fohlen	20,86	24,29	22,01	24,5	25,07	24,9	26,83
Adult	23,12	23,23	27,6	25,19	25,92	26,26	27,83

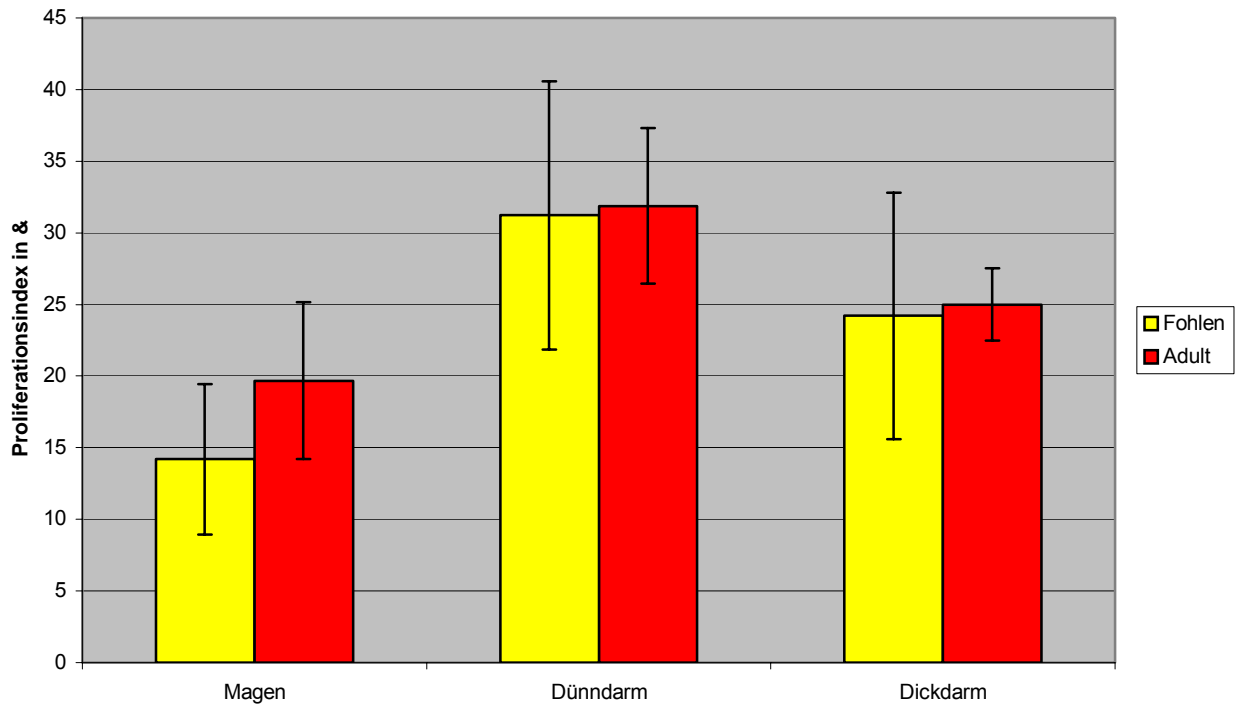


Abb.14: Proliferation – Einzellokalisationen zusammengefasst und gemittelt

Die in Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse ergeben nach Durchführung der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich des Faktors ‚Lokalisation‘ folgende Resultate:

- 1.) Die globalen Unterschiede zwischen den Gruppen (Fohlen / Adult)  $\Rightarrow p = 0,45$ ; das bedeutet **nicht signifikant**.
- 2.) Die Wechselwirkung zwischen Lokalisation und Gruppe  $\Rightarrow p = 0,29$ ; das bedeutet **nicht signifikant**.
- 3.) Die Unterschiede in der Proliferation zwischen den einzelnen Grob-Lokalisationen (Magen, Dünndarm, Dickdarm), gemittelt über Fohlen / Adult  $\Rightarrow p < 0,0001$ ; das bedeutet **hoch signifikant**



Aus den durchgeführten statistischen Berechnungen ergeben sich also signifikante Unterschiede im Bereich des Magens bezüglich der Gruppe (siehe Abb.11) und im Vergleich der Grob-Lokalisationen (siehe Abb.14). Betrachtet man die anderen Abschnitte des MDT, so ergeben sich für Dünndarm und Dickdarm keine signifikanten Unterschiede, sondern auffallend gleiche Proliferationsindices. Daher wurde hier auf die Darstellung der einzelnen p-Werte verzichtet.

Für die einzelnen Ergebnisse wurden die Tabellen im Anhang aufgelistet. Dort erkennt man anhand der angegebenen Werte bei genauer Betrachtung, dass sich Unterschiede zwischen den Proliferationsindices auch noch innerhalb der Gruppen ergeben. Bezieht man das Alter mit ein, so erkennt man Unterschiede zwischen 1 Tag alte Fohlen und über 8 Tage alte Fohlen, jedoch reicht die untersuchte Probandenmenge nicht aus um eine statistisch abgesicherte Aussage treffen zu können.

## **V. Diskussion**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es mit Hilfe des in der Humanmedizin vielfach beschriebenen und etablierten Proliferationsmarkers MIB-1 möglich ist, die Proliferation von Epithelzellen am Magen- und Darmepithel des Pferdes sichtbar zu machen und realistisch zu erfassen. Diese Methode, unter Verwendung des MIB-1 gegen das zelluläre Ki-67 Protein, wird in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Besondere Bedeutung hat dieses Protein erlangt, weil seine Expression alleinig in proliferierenden Zellen in der G1-, S-, G2- und M-Phase nicht jedoch in G0 arretierten Zellen auftritt (Gerdes et al. 1984). Aufgrund dieser Eigenschaft wird Ki-67 heute als wichtiger Proliferationsmarker genutzt.

Dieser Proliferationsnachweis wurde bisher am Magen – und Darmtrakt vom Pferd noch nicht beschrieben. Damit kann die allgemeine Aussage von Scholzen et al. (2000), dass der MIB-1 an Geweben vom Pferd funktioniert, bestätigt werden und um die Erkenntnis, dass dies nun auch am MDT möglich ist, bereichert werden. Der Nachweis, dass es sich hier um proliferierende Zellen handelt wurde hier auch durch die positive Anfärbung der Lymphozyten mit dem Antikörper MIB-1 vor allem im Bereich des Ileums (Peyersche Plaques) erbracht. Diese Möglichkeit der Positivkontrolle wurden bereits in mehreren früheren Arbeiten beschrieben (Herraez et al. 2001; Roffler et al. 2003).

Eine Fragestellung der Arbeit war, ob die Lokalisation der proliferierenden Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes bei Pferden mit der anderer Haussäugetiere zu vergleichen ist. Dafür müssen die in früherer Literatur beschriebenen Verteilungsmuster der sich teilenden Zellen bei anderen Säugetieren mit denen des Pferdes verglichen werden.

### **Ki-67 im Magen**

Für den Magen ergibt sich, dass die im Fundusdrüsenepithel der Ratte erstmals von Stevens und Leblond (1953) beschriebene Proliferationszone im Isthmus auch beim Pferd im Magenepithel vorhanden ist. Es ist zu beachten, dass anhand der lichtmikroskopischen Auswertung nur schwer eine Differenzierung der einzelnen Epithelzelltypen durchzuführen ist. Man kann bei den hier ausgewerteten Zellen nur von Drüsen- und Oberflächenepithelzellen sprechen, bzw. je nach Region noch allgemeiner von Magenepithelzellen. Eine hohe Dichte der proliferierenden, Ki-67 positiven Epithelzellen in der Fundusdrüsenregion des Pferdes zeigt sich sehr deutlich im Bereich des Isthmus. Betrachtet man die anderen Abschnitte des Magens, die Pylorusdrüsenzzone und den Margo

plicatus, so wird deutlich, dass das Verteilungsmuster im drüsenhaltigen Bereich des Magens gleich bleibt. Es ist stets der Bereich um den Isthmus der Magendrüsen, an welchem eine hohe Anzahl Ki-67 positiver Zellen zu finden ist, unabhängig davon ob es sich um ein Fohlen oder ein adultes Pferd handelt.

Die Proliferationsvorgänge im Oberflächenepithel konzentrieren sich auf den Grund der Foveolae gastricae. Vom Isthmusbereich werden Zellen hervorgebracht, welche dann in der weiteren Differenzierung entweder die Richtung zum Lumen hin oder zum Drüsengrund einschlagen, je nachdem ob es sich um Oberflächenepithelzellen oder Drüsenzellen (Haupt- und Belegzellen bzw. Pylorusdrüsenzellen) handelt, bzw. welche physiologischen Funktionen von den Zellen übernommen werden. Sommer und Kressin lokalisieren mit Hilfe des Ki-67 Nachweises beim adulten Rind die Proliferationszone ebenfalls im Bereich des Isthmus (2001).

Schon in früheren Untersuchungen sind Ansätze zu finden, einen zeitlichen Unterschied in der Proliferationsrate zu messen. Vor allem im Zeitraum um die Futteraufnahme wurde ein starker Anstieg der proliferativen Prozesse im Bereich der Schleimhaut des Magens bei Hunden beobachtet (Willems et al. 1972). Untersuchungen zu altersabhängigen Unterschieden bezüglich der Proliferationsrate sind in der Literatur nicht explizit beschrieben.

### **Ki-67 im Darm**

Ein ganz anderes Verteilungsmuster der Proliferationszonen liegt im *Dünndarm* vor - bedingt durch die organotypische Morphologie und Funktion der Darmmukosa. Zum Lumen hin erstrecken sich als fingerförmige Ausstülpungen der Lamina propria mucosae die Zotten, Villi intestinales, die dicht aneinandergereiht die Oberfläche des Dünndarms säumen. An der Basis der Zotten senken sich die Glandulae intestinales, Lieberkühn'sche Krypten in die Tiefe ein. Die epitheliale Schicht des Dünndarms setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Saumzellen auch als Enterozyten bezeichnet säumen die gesamte Oberfläche und sind luminal mit Mikrovilli ausgestattet. Neben diesen existieren Becherzellen, verantwortlich für die Produktion des protektiven Schleimes und verschiedene endokrine Zellen, die ebenfalls intraepithelial liegen. Tiefer am Drüsengrund liegen vereinzelt Paneth-Zellen, ebenfalls sezernierende Zellen.

Vergleicht man die Lokalisationen der Ki-67 positiven Zellen so wird deutlich, dass sich die Mehrheit der proliferierenden Zellen in der Kryptenbasis befindet. Nur vereinzelt finden sich mitotisch aktive Zellen oberhalb dieses Bereiches, in den Zotten. Vom Grund der Krypten,

dem Sitz der Stammzellen, aus erfolgt die ständige Regeneration der Epithelzellen. Diese Zellen wandern oberflächenwärts und gehen dort zugrunde. Der Prozess der kontinuierlichen physiologischen Zellerneuerung läuft im Gegensatz zum Magen nur in eine Richtung, die Zellen wandern unter weiterer Differenzierung zum Lumen und werden dort abgeschilfert (Wong et al. 1999).

Diese verschiedenen Arten der Zellerneuerung und -differenzierung erklären warum bei den vorliegenden Auswertungen der lichtmikroskopischen Präparate auch unterhalb des Isthmusbereiches der Magendrüsen noch einzelne Ki-67 positive Zellen zu finden sind. Im Gegensatz dazu kann man im Bereich des Dünndarmes auf Höhe der Kryptenbasis eine klare Linie ziehen: Darunter sind keine proliferierenden Epithelzellen mehr anzutreffen.

Im *Dickdarm* finden sich morphologische Unterschiede zum Dünndarm, die wichtigste Unterscheidung, es existieren keine Villi intestinales (Zotten) und es findet sich eine deutlich höhere Anzahl von Becherzellen im Epithel.

Vergleicht man die Dünn- und Dickdarmabschnitte untereinander so fällt auf dass im Bereich des Dickdarmepithels der Hauptteil der Ki-67 positiven Zellen im unteren Drittel der Krypten konzentriert liegt, während im Dünndarm die sich teilenden Zellen deutlicher oberhalb des Kryptengrundes verteilt sind. Übereinstimmend mit Wille und Nakov (1990) finden sich intraepithelial auch nichtepitheliale Zellen.

Das Pferd weist somit die gleichen Verteilungsmuster der proliferierenden Epithelzellen im Magen-Darm-Trakt auf wie andere Säuger. So beschreiben Gordon und Hermiston (1994) vergleichbare Lokalisationen der proliferierenden Zellen am gastrointestinalen Epithel, sowohl bei neugeborenen als auch bei adulten Mäusen. Die gleichen Befunde erhebt auch Karam in seiner Arbeit (1999). Sommer und Kressin (2001) fanden mit Hilfe des Ki-67 Nachweises entsprechende Proliferationszonen im Magen von adulten Rindern. Beim Menschen werden die gleichen Proliferationszonen beschrieben (Willis et al. 1999).

### **Proliferation bei Fohlen / adulten Pferden**

Eine weitere Zielstellung der Arbeit war herauszufinden, ob es Unterschiede bezüglich der Proliferation im Epithel des Magen-Darm-Traktes zwischen Fohlen und Adulten gibt. Dazu wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, die Auszählungen der einzelnen Darmabschnitte statistisch ausgewertet und die Gruppen miteinander verglichen. Es zeigen sich signifikante Unterschiede in der Proliferationsintensität (Proliferationsindex in %) zwischen Fohlen und Adulten im Bereich des Pars glandularis des Magens. Fohlen weisen

einen fast um die Hälfte geringeren Proliferationsindex (Pi) im Fundus, im Pylorus und im Margo plicatus auf. Eine Ausnahme bildet hier der Pars nonglandularis, welcher einen etwas höheren Pi bei den Fohlen als bei den Adulten aufweist. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden dass der drüsenhaltige Teil der Magenschleimhaut bei den Fohlen geringer zu proliferieren scheint als bei den Adulten. Eine Erklärung dafür ist in der Literatur nicht beschrieben, könnte aber zum einen darin liegen, dass dem Magen der Fohlen völlig andersartige Nahrung zugeführt wird als dem Magen adulter Pferde. Zum anderen könnte ein Zusammenhang bestehen mit einer altersabhängigen Zunahme der Zellzahl in den jeweiligen Magen-und Darmepithelien.

Es ist bekannt dass mit zunehmendem Alter auch die Anzahl spezifischer Zellen, wie Beleg- und Hauptzellen im Epithelverband des Rattenmagens ansteigt (Jacobs et al. 1984). In einer Studie von Krause et al. (1976) wurde festgestellt, dass im juvenilen Alter, speziell in der postnatalen Periode, im Opossum vor allem die pepsinproduzierenden Hauptzellen noch nicht vorhanden sind. Für die geringere epitheliale Proliferation im Drüsenteil des Fohlenmagens könnte also eine vom adulten Pferd abweichende quantitative und qualitative Zusammensetzung des Epithelzellverbandes verantwortlich sein, zum Beispiel ein geringerer Anteil an Hauptzellen. Je nachdem wie stark die jeweiligen Zelltypen proliferieren (Stimulation durch externe Einflüsse, Bedarf an bestimmten Substanzen) resultiert daraus ein unterschiedlicher Proliferationsindex.

Die Mächtigkeit des Epithels kann ebenfalls Einfluss auf den Proliferationsindex haben. Vor allem im Bereich des Pars nonglandularis der Fohlen kommt es mit zunehmendem Alter zu einer starken Zunahme der Zellschichten, gut zu erkennen an der steigenden Anzahl der keratinisierten Zellen (Murray et al. 1993).

Betrachtet man die physiologischen Vorgänge im Magen in der postnatalen Periode, so ist zum einen die fast ausschließliche Aufnahme von Milch zum anderen die vom adulten Pferd verschiedene Sekretion von Elektrolyten und anderen Substanzen zu nennen (Xu 1996). Die einseitige Ernährung mit Milch in der frühen Lebensphase der Fohlen erfordert von Seiten der Magenschleimhaut eine Spezialisierung, da es hier vor allem auf die Aufspaltung der einzelnen Inhaltsstoffe der Milch ankommt und auf die Homogenisierung derselben. Für diese Vorgänge ist die Sekretion einer säurestabilen Lipase, gebildet durch die Hauptzellen im Magen, erforderlich (Huerou-Luron et al. 1992). Berücksichtigt man dass Milch eine Emulsion ist, so erscheint es sinnvoll als Reaktion des Organismus, die Oberfläche, nicht aber die Anzahl der einzelnen Zellen zu vergrößern, um damit eine Zunahme der Gesamtoberfläche zu erreichen, an der das Homogenisieren / Emulgieren effektiver ablaufen

kann (Xu 1996). Milch bedingt durch ihre physikalischen Eigenschaften eine weniger starke mechanische Belastung für die Epithelzellen und bringt daher auch eine geringere Abschilferung der oberflächlichen Zellen mit sich. Ausserdem ist die Sekretion bzw. Produktion von Säure und spaltenden Enzymen aufgrund der einseitigen Ernährung kaum mit den Vorgängen im adulten MDT vergleichbar. Diese Gegebenheiten sind eine mögliche Erklärung für die geringere Proliferation der Magenepithelzellen beim Fohlen.

Willems und Lehy beschreiben in ihrer Arbeit, dass gleichzeitig mit zunehmender Proliferation der Fundusepithelzellen beim Hund, stimuliert durch Gastrin, eine Größenabnahme dieser Zellen zu beobachten ist (1975). Nimmt man an dass Gastrin im juvenilen Alter durch eine geringere Anzahl von G-Zellen auch schwächer produziert wird, könnte das indirekt einen positiven Effekt auf die Ausdehnung der Zelloberfläche haben. Gastrin ist vor allem im Magen ein potentes Wachstumsstimulans. Dies konnte an transgenen Mäusen beobachtet werden, bei denen eine Überproduktion an Gastrin provoziert wurde und es dadurch zu einem 85 prozentigen Anstieg der Proliferation von Mucosazellen kam (Thomas et al. 2003).

Im Bereich des drüsenlosen Teils der Magenschleimhaut, der Pars nonglandularis des Fohlen ist hinsichtlich des Pi kein signifikanter Unterschied zum Adulten zu erkennen. Es ist lediglich eine Tendenz zu einer höheren Proliferation der Plattenepithelzellen zu erkennen. Wahrscheinlich spielt hier eine Rolle dass außer den typischerweise in einem mehrschichtigen Plattenepithel vorkommenden Zellen keine weiteren Zellen mit speziellen Funktionen hervorgebracht werden. Es finden in diesem Magenabschnitt auch keine weiteren Differenzierungen der vorhandenen Zellen statt, da hier nur wenig komplexe Vorgänge ablaufen. Verschieden davon verhält es sich in der Pars glandularis in welcher Pepsinogene, Salzsäure, Muzine und Hormone (Gastrin) sezerniert werden. Das bedeutet, die höhere Proliferation der Pars nonglandularis ist entweder ein Zufallsbefund oder Teil des physiologischen Wachstumsprozesses.

Eine weitere mögliche Erklärung für die niedrige Proliferationsrate des Pars glandularis der Fohlen im Vergleich mit der adulter Pferde könnte in der höheren Lebensdauer der einzelnen Zellen liegen. Bezogen auf die Lebensdauer der im Magen vorkommenden Zellen könnte das bedeuten, dass aufgrund der oben bereits erwähnten geringeren Exposition der Magenschleimhaut des Fohlens und der anderen Ansprüche im Hinblick auf die Sekretion von bestimmten Enzymen, beides bedingt durch die monotone Milchdiät, die Lebensdauer der Zellen höher ist als bei den Adulten. Daraus resultiert ebenfalls ein geringerer Bedarf an neuen Zellen und daher ein geringerer Pi. Studien zeigten einen entsprechenden

Zusammenhang an Ratten. Es wurde beobachtet, dass juvenile Tiere nicht nur geringere Zellzahlen bestimmter Zelltypen im Magenepithel zeigten, sondern auch unterschiedliche Volumina der Epithelzellen (Jacobs et al. 1984; Tatematsu et al. 1989).

Für die einzelnen Dünndarmabschnitte von Fohlen und adulten Pferden ergeben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsrate der Epithelzellen. Der Dickdarm zeigt bezüglich der Mitoserate in seinen Abschnitten ebenfalls keine deutlichen Unterschiede. Im Darm ist auffällig, wie nah die berechneten Proliferationsindizes der Fohlen und der Adulten jeweils zusammenliegen. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Ratten bei denen die Neugeborenen während der Saugphase eine signifikant geringere Zellteilungsrate im Dünndarm gegenüber älteren Tieren zeigen (Pacha 2000).

Vergleicht man die Einzellokalisationen des Dünndarms miteinander und verfährt ebenso mit denen des Dickdarms, so ergeben sich jeweils nur geringe Unterschiede. Deutlicher wird allerdings der Unterschied zwischen Dünndarm und Dickdarm in ihrer Gesamtheit. Hier weist der Dünndarm im Durchschnitt eine Proliferationsrate von ca. 32 %, der Dickdarm von nur ca. 25 % auf. Dieser Unterschied zwischen Dünn- und Dickdarm ist möglicherweise in der unterschiedlichen Funktion beider Darmabschnitte begründet. Der Dünndarm ist der Hauptort der Abbauvorgänge und enzymatischen Spaltungen, der Resorption von Nährstoffen, Spurenelementen, Vitaminen, Wasser und Elektrolyten. In das proximale Dünndarmlumen münden Gallen- und Pankreassekrete. Dem Dickdarm kommt vielmehr nur noch die Absorption von Wasser und Elektrolyten zu und es laufen aufgrund der bakteriellen Besiedlung zahlreiche mikrobielle Umsetzungen ab. Dies erfordert seitens des Dickdarms keine spezielle Zusammensetzung der Epithelzellen.

Aufgrund der besonderen Anforderungen im Hinblick auf Resorption, Sekretion und protektive Maßnahmen der Schleimhaut ist es zu erklären, warum der Dünndarm sowohl bei den Fohlen als auch den Adulten hohe Proliferationsleistungen erbringen muss. Der Fohlendarm muss im Hinblick auf die Versorgung mit Nährstoffen, dazu kommen in den ersten Lebenstagen auch maternale Immunglobuline, weitaus höheren Ansprüchen gerecht werden als der Darm des erwachsenen Pferdes. Aufgrund dieser speziellen Gegebenheiten versucht der juvenile Organismus mit einer verstärkten Bildung von neuen Zellen diesen Zeitraum der postnatalen Periode gutmöglichst zu überbrücken (Pacha 2000). Eine wichtige Rolle spielen dabei bestimmte Faktoren, wie die Wachstumshormone EGF (epidermal growth factor) und IGF (insulin-like growth factor). In Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass EGF und IGF, beide bei Kälbern in hoher Konzentration im Kolostrum

vorhanden, eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Darmepithelzellen haben (Xu 1996; Roffler et al. 2003). Ausser diesen beiden vor allem für die kolostrale Phase wichtigen Hormonen haben Gastrin, Bombesin, Glucagon-like Peptide, Neurotensin und Cholecystokinin eine erwiesene stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation gastrointestinalen Gewebes, wobei je nach Hormon die stimulierende Wirkung unterschiedlich stark in den einzelnen Abschnitten des MDT ist (Thomas et al. 2003). So hat Gastrin seinen Angriffspunkt vor allem im Magen, Bombesin hauptsächlich im Dünndarm. Neurotensin stimuliert dagegen die Proliferation von Colon-Mukosazellen bei juvenilen und adulten Ratten in hohem Maße (Evers et al. 1992).

Neben adaptiven Maßnahmen des juvenilen Organismus, im Vordergrund steht hier vor allem die postnatale Phase, ist anzuführen, dass sich bei Neugeborenen die Lebensdauer der Enterozyten von denen der Adulten unterscheidet. So weisen einige der Zellen im noch unreifen Darm von Nagern generell eine längere Lebensdauer auf als im adulten Darm (Pacha 2000). Bei Equiden könnten ähnliche Vorgänge für die Proliferation der Darmepithelzellen eine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass Kolostrum von Stute und Kuh eine erhöhte Konzentration von EGF aufweist (Murray et al. 1992; Roffler et al. 2003). Daher wäre zu erwarten, dass es auch bei Fohlen zu einer stimulierten Proliferation von Darmepithelzellen kommt. Dies konnte jedoch in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Die Proliferationsintervalle sind möglicherweise bei Fohlen aufgrund einer erhöhten Lebensdauer der Mukosazellen verlängert - im Gegensatz dazu steht eine stimulierten Proliferation durch EGF bei den Fohlen, es könnte daher zu einer Art Gleichgewicht zwischen erniedrigter und erhöhter Proliferation kommen. Dies könnte erklären, warum die Mitoseraten kaum von der adulter Pferde abweicht.

Es bleibt die Frage nach der möglichen Bedeutung der proliferativen Prozesse für pathophysiologische Veränderungen im Verdauungstrakt der neugeborenen und der adulten Pferde.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit für den Magen, stellt sich die Frage, ob die geringere Proliferation eine Ursache für bestimmte gastrale bzw. darüber hinaus nachfolgende intestinale Erkrankungen sein könnte.

Zum einen könnte der immature Zustand des Magenepithels, das bedeutet eine vom Adulten verschiedene Zusammensetzung und Anzahl von Zelltypen im Epithel (Murray et al. 1993; Murray 1999), eine differente Sekretion von bestimmten Ionen wie  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{K}^+$  bedingen. Wie weiter oben erwähnt gibt es Studien über das Vorkommen spezifischer Zellen



in der Magenschleimhaut, welche aussagen, dass speziesabhängig bei Neugeborenen keine bzw. kaum Hauptzellen vorhanden sind. Möglich wäre, dass es sich mit bestimmten Zelltypen im equinen Magen ähnlich verhält bzw. die Anzahl dieser Zellen geringer ist. Die in dieser Arbeit gemessene geringere Proliferation im Magenepithel bezieht sich auf Fohlen in einem Lebensalter bis zum 21. Tag nach der Geburt. Die niedrige Mitoserate der Magenepithelzellen könnte eine Erklärung sein, warum beim neonatalen Fohlen in einem Zeitraum von der Geburt bis zu einem Alter von drei Monaten der pH-Wert im Magen erst mit zunehmendem Alter sinkt (Baker et al. 1993), da es die Belegzellen sind, die für die Produktion von Salzsäure (HCl) zuständig sind. Magenulzera sind bekannt beim Fohlen und treten nicht selten genau in diesem frühen Zeitraum auf (Argenzio 1999). Berücksichtigt man Faktoren, wie Störungen des Säure-Basen-Haushaltes, geringere Produktion von Mucinen durch die Neben- und Oberflächenzellen so kann es schnell zu Schleimhautläsionen kommen und daraus folgend zu Magenulzera. Bislang sind beim Fohlen noch keine bakteriellen Ursachen für die Entstehung von Magenulzera nachgewiesen. Im Gegensatz dazu steht die Vergesellschaftung mit *Helicobacter pylori* beim Menschen. Die Magenulzera beim Fohlen weisen möglicherweise eine multifaktorielle Pathogenese auf, in der eine geringere Zellproliferationsrate im Hinblick auf eine geringere Produktion von Schleimhaut-protectiven Stoffen eine wichtige Rolle spielen könnte. Wäre es möglich spezifisch die Zellteilung von Neben- und Oberflächenzellen zu stimulieren, könnte man damit vielleicht einen inhibitorischen Effekt auf die Entstehung von Magenulzera erzielen. Es ist also eher davon auszugehen, dass bei Fohlen eine geringere Produktion von Mucinen vorliegt als eine gesteigerte Salzsäureproduktion aus den Belegzellen, wenn man die geringere Teilungsrate der Magenepithelzellen berücksichtigt.

Eine weitere gastrointestinale Funktionsstörung ist die Diarrhoe, welche vor allem bei neugeborenen Fohlen im Zeitpunkt der ersten Rosse des Muttertieres, daher auch Fohlenrossediarrhoe genannt, eine wichtige Rolle spielt. Die Fohlenrossediarrhoe ist nicht auf ein monokausales Geschehen zurückzuführen, sondern stellt eine Faktorenerkrankung dar (Wiedemann 1997). Möglicherweise spielt auch die epitheliale unterschiedliche Proliferation bei Fohlen und Adulten im Magen einerseits und die sehr eng beieinander liegenden Mitoseraten im Dünn- und Dickdarm andererseits eine Rolle für die Genese dieser Erkrankung

Unter der Annahme, dass aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten geringeren epithelialen Proliferation im Magen die zytoprotektiven Prozesse geringer sind, und eine

geringere Menge an HCl produziert wird (vgl. Murray 1999), könnte es sein, dass es dadurch schon im Magen zu einer zeitweisen Erhöhung von Bakterienkulturen durch die geringere bakterizide Wirkung der Salzsäure kommt. Diese Bakterien könnten dann auch den Darm besiedeln und daher mit an der Entstehung der Fohlenrossediarrhoe beteiligt sein. Also könnten schon im Magen die Voraussetzungen für die Entstehung dieser Erkrankung geschaffen werden.

Im Zuge der komplexen Prozesse die im juvenilen Dünndarm ablaufen kann es auch zu pathophysiologischen Veränderungen kommen. Die Adaption an Umwelteinflüsse durch die aufgenommene Nahrung, die strukturellen Veränderungen der Darmmucosa, die hohe Proliferationsleistung im Vergleich zu Magen und Dickdarm und die gleichzeitig hohen Anforderungen an die Resorptionsfähigkeit können eine Störung des sensiblen Gleichgewichts des Flüssigkeitshaushaltes bedingen. Weiterhin kann es zu einer Schwächung der Immunabwehr kommen, unter anderem durch die geringere Sekretion von IgA, und resultierend daraus kurzzeitig zu erhöhten Bakterienkonzentrationen. Es konnte gezeigt werden, dass im unreifen Darm von neugeborenen Säugern bestimmte Bakterientoxine eine Steigerung der Sekretion von Flüssigkeit in das Lumen verursachen, da der immature Darm für diese Enterotoxine eine höhere Sensitivität aufweist (Pacha 2000). Offensichtlich gibt es beim Pferd altersabhängige Unterschiede in der Anzahl spezifischer Rezeptoren. Einen Hinweis gibt die Studie von Aupperle et al. (2000) in der gezeigt wird, dass bei hoher Proliferationsrate von Endometriumszellen, gemessen mit Ki-67, auch eine hohe Expression von Rezeptoren einhergeht. Wenn man bedenkt, dass der Fohlendünndarm eine hohe Leistung in der Zellteilung erreicht ( $P_i \approx 31\%$ ) so könnte man sich vorstellen, dass hier ebenfalls eine hohe Anzahl von Toxin-spezifischen Rezeptoren vorhanden ist. Durch die oben genannten Faktoren kann es beim Fohlen zu einer sekretorischen Diarrhoe kommen.

Im Bereich der neoplastischen Erkrankungen des MDT beim Pferd spielt das Ki-67 Antigen als Proliferationsmarker eine wichtige Rolle.

Statistiken besagen, dass neoplastische Veränderungen im Magen-Darm-Trakt von Pferden einen nicht zu vernachlässigenden Anteil am Gesamtbild gastrointestinaler Erkrankungen einnehmen. So wurden in verschiedenen Arbeiten Pferde mit Koliken untersucht und dabei mit einer Häufigkeit von bis zu 5 % Neoplasien im Darm gefunden. Es handelte sich meist um Lymphosarkome, die für die rezidivierenden Koliken verantwortlich gemacht wurden (Hillyer et al. 1997; Mair et al. 1997).

Um eine Aussage über die Qualität des Tumors treffen zu können, muss entweder intraoperativ eine Probe entnommen werden oder postmortal die Diagnose erfolgen.

Durch den Nachweis des Ki-67 Antigens könnte man relativ einfach neoplastische Veränderungen anhand von Schleimhautbiopsien diagnostizieren und klassifizieren, bzw. die Wachstumsrate messen und eine prognostische Aussage treffen. Diese Möglichkeit der Voraussage in Bezug auf das weitere Verhalten spezieller Tumoren wurde bei Hunden und Katzen schon verwendet (Roels et al. 1999). An equinen Sarkoiden wurde ebenfalls eine Studie durchgeführt (Martens et al. 2000), hier waren jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Differenzierung der Tumoren zu erkennen.

Vorstellbar für die Zukunft wäre der Ki-67-Nachweis im Epithel des MDT beim Pferd als eine praktikable Methode in der postoperativen Diagnostik. Nach durchgeführter Kolikoperation und Entnahme einer Biopsie kann die Regenerationsfähigkeit von Darmteilen anhand der Mitoserate festgestellt werden. Kurzzeitig ischämische oder teilweise nekrotische Darmteile, stellen eine schwierige Herausforderung an den behandelnden Tierarzt – nämlich eine Prognose im Hinblick auf das weitere Überleben des operierten Pferdes.

Die vorliegende Arbeit liefert Ergebnisse über die epitheliale Proliferationsrate und – lokalisation in den einzelnen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes von Fohlen und adulten Pferden. Es ist noch Bedarf genauer zu klären, welche der verschiedenen Zelltypen vorrangig am Proliferationsgeschehen teilnehmen. Bei genauer Spezifizierung dieser proliferierenden Zellen wäre es möglich, pathophysiologische Veränderungen bestimmten Zellen und ihrer Funktion zuzuordnen und somit exakter zu beschreiben. In einer weiteren Arbeit könnte das Alter der zu untersuchenden Fohlen stärker eingegrenzt oder in verschiedene Gruppen unterteilt werden, damit man einen besseren Überblick hat, in welchem Lebensalter welche Zellen des Gastrointestinaltraktes welche Teilungsprozesse durchlaufen.

## VI. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Proliferation der Epithelzellen des Magen-Darm-Traktes von Fohlen und adulten Pferden zu untersuchen. Erstmals wurde hierzu die Ki-67-Immunhistochemie angewendet. Besonderes Augenmerk wurde nicht nur auf organotypische bzw. regionale Unterschiede gelegt, sondern auch auf einen Vergleich der Proliferation beider Altersgruppen.

Hierzu wurden jeweils 14 definierte Proben aus dem MDT von 11 Fohlen und 7 adulten Pferden direkt nach dem Tod der Tiere entnommen und für eine lichtmikroskopische und darauf folgende immunhistochemische Untersuchung aufgearbeitet. Die Expression des Ki-67 Antigens wurde mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 bestimmt und der Anteil der markierten Zellen an der Gesamtpopulation als Ki-67 Index in Prozent angegeben.

Vergleicht man die Ergebnisse für den adulten Pferdemagen mit denen für das Fohlen ergeben sich signifikante Unterschiede in der Proliferationsrate. Im Bereich der Pars glandularis weisen Fohlen einen deutlich geringeren Proliferationsindex auf:

Fundus	Pi: Fohlen 9,43 %	Adult 16,95 %	p=0,0016
Margo plicatus	Pi: Fohlen 19,96 %	Adult 32,72	p=0,03
Pylorus	Pi: Fohlen 11,42	Adult 21,25	p=0,007

Kein signifikanter Unterschied ergibt sich für die Pars nonglandularis.

Lokalisiert ist der Hauptteil der proliferierenden Zellen im Magen im Bereich des Isthmus der Magendrüsen. Möglicherweise steht die im Vergleich zum Adulten geringere Proliferationsrate der Pars glandularis des Magens der Fohlen im Zusammenhang mit einer höheren Lebensdauer der Epithelzellen und verschiedenen Adaptionsvorgängen des Neugeborenen.

Im Dünndarm und Dickdarm der beiden Altersgruppen liegen die durchschnittlichen Teilungsraten der Darm-Epithelzellen sehr dicht zusammen:

Dünndarm:	Pi: Fohlen 31,22 %	Adult 31,88 %
Dickdarm:	Pi: Fohlen 24,20 %	Adult 24,99 %

Einen Unterschied zum Magenepithel zeigt das Verteilungsmuster der sich teilenden Zellen im Darm, dort sind es die Krypten, auf die sich die mitotischen Zellen konzentrieren. Es kann vermutet werden, dass bei Fohlen neben proliferationsstimulierenden auch inhibitorische Faktoren die Proliferation der Darmepithelzellen beeinflussen und es somit zu einem Angleichen an die Mitoseaktivität der adulten Pferde kommt.

Im Hinblick auf verschiedene Erkrankungen des MDT könnte Ki-67 in Zukunft auch beim Pferd mehr Bedeutung zukommen, vor allem im Bereich der neoplastischen Veränderungen des MDT, sowie der postoperativen Prognostik.

## VII. Summary

The aim of the present study was to investigate the proliferation of the epithelial cell in the stomach and the intestine of newborn and adult horses. For the first time the Ki-67 immunohistochemistry was applied in this study. Special interest was to see if there would be tissue-specific or regional differences comparing the gastrointestinal epithelium of foals and adults.

The defined epithelial tissue specimens (n=14) were taken out of each of 11 foals and 7 adults stomach and intestine directly after animals were killed. After that the epithelial specimen were prepared for lightmicroscopical and following immunohistochemical investigation. The monoclonal MIB-1 an anti-Ki-67-antibody was used to detect Ki-67. The part of the Ki-67 positive cells is given by the proliferation index (Pi) in percent.

It could be proven that it is possible to determine proliferating activity with Ki-67 on gastrointestinal tissues in horses. The results show that there are significant differences concerning the proliferation in the pars glandularis of the stomach. Comparing the proliferation rate in foals to adults in this part the newborns show less proliferation:

Fundus	Pi: foals 9,43 %	adults 16,95 %	p=0,0016
Margo plicatus	Pi: foals 19,96 %	adults 32,72	p=0,003
Pylorus	Pi: foals 11,42	adults 21,25	p=0.007

There is no significant difference in the pars nonglandularis. The main part of the proliferating cells were localized in the isthmus region in the pars glandularis of the stomach. Maybe the smaller proliferation rate in the pars glandularis of the stomach in foals is related to a higher lifespan of epithelial cells and different adaptative processes.

In the small and in the large intestine both age groups show no visible differences in the average proliferation rate:

Small intestine:	Pi: foals 31,22 %	adults 31,88 %
Large intestine:	Pi : foals 24,20%	adults 24,99 %

In contrast to the distribution pattern in the stomach the intestine cells proliferated most extensively in the crypt area to the bottom of the tunica mucosa. It could be suggested that besides proliferation-stimulating factors also inhibitoric factors affect the proliferation of the intestinal epithelial cells in foals. This could be the reason why the proliferation rate of the foals is close to the one of the adult horses.

Considering gastrointestinal diseases in horses, Ki-67 could become more important in future. Primarily neoplasias in the gastrointestinal tract and in postoperative prognostics.

## VIII. Literaturverzeichnis

1. **Aaltomaa, S; Lipponen, P; Vesalainen, S; Ala-Opas, M; Eskelinen, M und Syrjanen, K**  
Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. Eur Urol, **32**: 410-415 (1997)
2. **Al zi'abi, MO; Watson, ED und Fraser, HM**  
Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. Reproduction, **125**: 259-270 (2003)
3. **Argenzio, RA**  
Comparative pathophysiology of nonglandular ulcer disease: a review of experimental studies. Equine Vet J Suppl, 19-23 (1999)
4. **Aupperle, H; Ozgen SSchoon, HA; Schoon, D; Hoppen, HO; Sieme, H und Tannapfel, A**  
Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. Equine Vet J, **32**: 228-232 (2000)
5. **Baker, SJ und Gerring, EL**  
Gastric pH monitoring in healthy, suckling pony foals. Am J Vet Res, **54**: 959-964 (1993)
6. **Birner, P; Ritzi, M; Musahl, C; Knippers, R; Gerdes, J; Voigtlander, T; Budka, H und Hainfellner, JA**  
Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. Am J Pathol, **158**: 1991-1996 (2001)
7. **Boenisch T und Naish SJ (Hrsg.)**  
Färbemethoden. Handbuch II immunchemischer Färbemethoden, DAKO Corporation, 22-27 (1989)
8. **Brown, DC und Gatter, KC**  
Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology, **17**: 489-503 (1990)

9. **Bruno, S und Darzynkiewicz, Z**  
Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*, **25**: 31-40 (1992)
10. **Buban, T; Schmidt, M; Broll, R; Antal-Szalmas, P und Duchrow, M**  
Detection of mutations in the cDNA of the proliferation marker Ki-67 protein in four tumor cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*, **149**: 81-84 (2004)
11. **Cairnie AB; Lamerton LF und Steel GG**  
Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. *Experimental Cell Research*, **39**: 528-538 (1965)
12. **Cattoretti, G; Becker, MH; Key, G; Duchrow, M; Schluter, C; Galle, J und Gerdes, J**  
Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, **168**: 357-363 (1992)
13. **Dixon, W J c e**  
BMDP Statistical Software Manual. Volume 1 und 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, (1993)
14. **Endl, E und Gerdes, J**  
The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res*, **257**: 231-237 (2000)
15. **Evers, BM; Izukura, M; Chung, DH; Parekh, D; Yoshinaga, K; Greeley, GH, Jr.; Uchida, T; Townsend, CM, Jr. und Thompson, JC**  
Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. *Gastroenterology*, **103**: 86-91 (1992)
16. **Falini, B; Flenghi, L; Fagioli, M; Stein, H; Schwarting, R; Riccardi, C; Manocchio, I; Pileri, S; Pelicci, PG und Lanfrancone, L**  
Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. *Histochem Cytochem*, **37**: 1471 -1478 (1989)



17. **Gelsleichter, L; Gown, AM; Zarbo, RJ; Wang, E und Coltrera, MD**  
p53 and mdm-2 expression in malignant melanoma: an immunocytochemical study of expression of p53, mdm-2, and markers of cell proliferation in primary versus metastatic tumors. *Mod Pathol*, **8**: 530-535 (1995)
18. **Gerdes, J; Schwab, U; Lemke, H und Stein, H**  
Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, **31**: 13-20 (1983)
19. **Gerdes, J; Lemke, H; Baisch, H; Wacker, HH; Schwab, U und Stein, H**  
Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, **133**: 1710-1715 (1984)
20. **Gerdes, J; Li, L; Schlueter, C; Duchrow, M; Wohlenberg, C; Gerlach, C; Stahmer, I; Kloth, S; Brandt, E und Flad, HD**  
Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, **138**: 867-873 (1991)
21. **Gerdes, J; Becker, MH; Key, G und Cattoretti, G**  
Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol*, **168**: 85-86 (1992)
22. **Gerlach, C; Golding, M; Larue, L; Alison, MR und Gerdes, J**  
Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab Invest*, **77**: 697-698 (1997)
23. **Gerstenberg, C; Allen, WR und Stewart, F**  
Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. *J Reprod Fertil*, **117**: 143-152 (1999a)
24. **Gerstenberg, C; Allen, WR und Stewart, F**  
Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. *J Reprod Fertil*, **116**: 167-175 (1999b)

25. **Gordon, JI und Hermiston, ML**  
Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*, **6**: 795-803 (1994)
26. **Griffey, SM; Kraegel, SA und Madewell, BR**  
Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and mitotic counts. *J Comp Pathol*, **120**: 321-332 (1999)
27. **Herraez, P; Berridge, B; Marsh, P; Weeks, B und Ramiro-Ibanez, F**  
Small intestine large granular lymphoma in a horse. *Vet Pathol*, **38**: 223-226 (2001)
28. **Hillyer, MH und Mair, TS**  
Recurrent colic in the mature horse: a retrospective review of 58 cases. *Equine Vet J*, **29**: 421-424 (1997)
29. **Huerou-Luron, I; Guilloteau, P; Wicker-Planquart, C; Chayvialle, J A; Burton, J; Mouats, A; Toullec, R und Puigserver, A**  
Gastric and pancreatic enzyme activities and their relationship with some gut regulatory peptides during postnatal development and weaning in calves. *J Nutr*, **122**: 1434-1445 (1992)
30. **Ito, T; Mitui, H; Udaka, N; Hayashi, H; Okudela, K; Kanisawa, M und Kitamura, H**  
Ki-67 (MIB 5) immunostaining of mouse lung tumors induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Histochem Cell Biol*, **110**: 589-593 (1998)
31. **Jacobs, DM und Ackerman, SH**  
Differential growth rate of rat gastric mucosal cells during postnatal ontogeny. *Am J Physiol*, **247**: G645-G650 (1984)
32. **Jansen, RL; Hupperets, PS; Arends, JW; Joosten-Achjanie, SR; Volovics, A; Schouten, HC und Hillen, HF**  
MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer*, **78**: 460-465 (1998)

33. **Kanter, L; Blegen, H; Wejde, J; Lagerlof, B und Larsson, O**  
Utility of a proliferation marker in distinguishing between benign naevocellular naevi and naevocellular naevus-like lesions with malignant properties.  
Melanoma Res, **5**: 345-350 (1995)
34. **Karam, SM**  
Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. Front Biosci.,  
**4**: D286-D298 (1999)
35. **Karlsson, M; Boeryd, B; Carstensen, J; Franlund, B; Gustafsson, B; Kagedal, B; Sun, XF und Wingren, S**  
Correlations of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase fraction and survival in uveal melanoma. Eur J Cancer, **32A**: 357-362 (1996)
36. **Kataoka, K; Takeoka, Y und Maesako, J**  
Electron microscopic observations on immature chief and parietal cells in the mouse gastric mucosa. Arch Histol Jpn., **49**: 321-331 (1986)
37. **Kausch, I; Lingnau, A; Endl, E; Sellmann, K; Deinert, I; Ratliff, TL; Jocham, D; Szczakiel, G; Gerdes, J und Bohle, A**  
Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. Int J Cancer, **105**: 710-716 (2003)
38. **Kee, N; Sivalingam, S; Boonstra, R und Wojtowicz, JM**  
The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. J Neurosci Methods, **115**: 97-105 (2002)
39. **Kelley, LC und Mahaffey, EA**  
Equine malignant lymphomas: morphologic and immunohistochemical classification. Vet Pathol, **35**: 241-252 (1998)
40. **Kinoshita, Y und Ishihara, S**  
Mechanism of gastric mucosal proliferation induced by gastrin. J Gastroenterol Hepatol, **15 Suppl**: D7-11 (2000)

41. **Krause, WJ; Cutts, JH und Leeson, CR**  
The postnatal development of the alimentary canal in the opossum. II. Stomach. J Anat, **122**: 499-519 (1976)
42. **Krogh-Jensen, M; Johansen, P und D'Amore, F**  
Primary central nervous system lymphomas in immunocompetent individuals: histology, Epstein-Barr virus genome, Ki-67 proliferation index, p53 and bcl-2 gene expression. Leuk Lymphoma, **30**: 131-142 (1998)
43. **Laprie, C; Abadie, J; Amardeilh, MF; Raymond, I und Delverdier, M**  
Detection of the Ki-67 proliferation associated nuclear epitope in normal canine tissues using the monoclonal antibody MIB-1. Anat Histol Embryol., **27**: 251-256 (1998)
44. **Lavoie, JP; Drolet, R; Parsons, D; Leguillette, R; Sauvageau, R; Shapiro, J; Houle, L; Halle, G und Gebhart, CJ**  
Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada. Equine Vet J, **32**: 418-425 (2000)
45. **Liebich, HG**  
Funktionelle Histologie 2.Aufl. Verlag Schattauer, Stuttgart / New York, (1993)
46. **Lohr, CV; Teifke, JP; Failing, K und Weiss, E**  
Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by the standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. Vet Pathol, **34**: 212-221 (1997)
47. **Mair, TS und Hillyer, MH**  
Chronic colic in the mature horse: a retrospective review of 106 cases. Equine Vet J, **29**: 415-420 (1997)
48. **Martens, A; De Moor, A; Demeulemeester, J und Ducatelle, R**  
Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. Res Vet Sci, **69**: 295-300 (2000)

49. **Murray, MJ; Schaudies, RP und Cavey, DM**  
Epidermal growth factor-like activity in mares' milk. Am J Vet Res, **53**: 1729-1731 (1992)
50. **Murray, MJ und Mahaffey, EA**  
Age-related characteristics of gastric squamous epithelial mucosa in foals. Equine Vet J, **25**: 514-517 (1993)
51. **Murray, MJ**  
Pathophysiology of peptic disorders in foals and horses: a review. Equine Vet J Suppl, 14-18 (1999)
52. **Muskhelishvili, L; Latendresse, JR; Kodell, RL und Henderson, EB**  
Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. J Histochem Cytochem, **51**: 1681-1688 (2003)
53. **Narama, I; Masuoka-Nishiyama, M; Matsuura, T; Ozaki, K; Nagatani, M und Morishima, T**  
Morphogenesis of degenerative changes predisposing dogs to rupture of the cranial cruciate ligament. J Vet Med Sci, **58**: 1091-1097 (1996)
54. **Nickel, R; Schummer, A und Seiferle, E**  
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd II. Verlag Paul Parey, Berlin / Hamburg, (1987)
55. **Oikawa, M; Kaneko, M und Yoshikawa, T**  
Villous hypoplasia of the small intestine in neonatal foals. Zentralbl Veterinarmed A, **39**: 121-129 (1992)
56. **Pacha, J**  
Development of intestinal transport function in mammals. Physiol Rev, **80**: 1633-1667 (2000)
57. **Pinkerton, ME; Bailey, KL; Thomas, KK; Goetz, TE und Valli, VE**  
Primary epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma in a horse. J Vet Diagn Invest, **14**: 150-152 (2002)

58. **Ramsay, JA; From, L; Iscoe, NA und Kahn, HJ**  
MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol*, **105**: 22-26 (1995)
59. **Reszec, J; Kanczuga-Koda, L; Sulkowska, M; Koda, M; Cylwik, J; Barwijek-Machala, M und Sulkowski, S**  
An evaluation of Ki-67 and PCNA expression in conjunctival and eyelid tumours. *Folia Morphol (Warsz.)*, **63**: 95-98 (2004)
60. **Roels, S; Ducatelle, R; van D, V und De Kruif, A**  
Successful treatment of an equine preputial fibrosarcoma using 5-fluorouracil/evaluation of the treatment using quantitative PCNA and Ki67 (MIB 1) immunostaining. (case report). *Zentralbl Veterinarmed A*, **45**: 591-598 (1998)
61. **Roels, S; Tilmant, K und Ducatelle, R**  
PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol*, **121**: 13-24 (1999)
62. **Roels, S; Tilmant, K; Van Daele, A; Van Marck, E und Ducatelle, R**  
Proliferation, DNA ploidy, p53 overexpression and nuclear DNA fragmentation in six equine melanocytic tumours. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **47**: 439-448 (2000)
63. **Roffler, B; Fah, A; Sauter, SN; Hammon, HM; Gallmann, P; Brem, G und Blum, JW**  
Intestinal morphology, epithelial cell proliferation, and absorptive capacity in neonatal calves fed milk-born insulin-like growth factor-I or a colostrum extract. *J Dairy Sci*, **86**: 1797-1806 (2003)
64. **Sasaki, K; Murakami, T; Kawasaki, M und Takahashi, M**  
The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol*, **133**: 579-584 (1987)
65. **Scholzen, T und Gerdes, J**  
The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, **182**: 311-322 (2000)

66. **Slack, JM**  
Stem cells in epithelial tissues. Science, **287**: 1431-1433 (2000)
67. **Sommer, U und Kressin, M**  
Proliferation in the gastric epithelium of bovine abomasum during foetal development as revealed by Ki-67 immunocytochemistry. Anat Histol Embryol, **30**: 169-173 (2001)
68. **Stevens, CE und Leblond, CP**  
Renewal of the mucous cells in the gastric mucosa of the rat. Anat Rec, **157**: 231-246 (1953)
69. **Straume, O; Sviland, L und Akslen, LA**  
Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. Clin Cancer Res , **6**: 1845-1853 (2000)
70. **Tatematsu, M; Mutai, M; Aoki, T; de Camargo, JL; Furihata, C und Ito, N**  
Proliferation kinetics of pepsinogen altered pyloric gland cells in rats treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Carcinogenesis, **10**: 907-911 (1989)
71. **Thomas, RP; Hellmich, MR; Townsend, CM, Jr. und Evers, BM**  
Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues. Endocr Rev, **24**: 571-599 (2003)
72. **Thomson, AB und Keelan, M**  
The aging gut. Can J Physiol Pharmacol, **64**: 30-38 (1986)
73. **Wiedemann, P**  
Zum Komplex der Fohlenrossdiarrhoe: Klinische und Laborgebundene Untersuchungen. Giessen, Justus-Liebig-Universität Veterinärmedizin, Diss, (1997)
74. **Wilke, M**  
Transzervikale Endometriumbiopsie bei der Hündin- Technik, Repräsentanz, Aussagefähigkeit und Komplikationen. Hannover, Tierärztl.Hochsch., Diss, (2000)

75. **Wille, KH und Nakov, C**  
[Functional morphology of the large intestinal mucosa of horses (*Equus przewalskii* f. *caballus*) with special regard to the epithelium]. *Anat Histol Embryol*, **28**: 355-365 (1999)
76. **Willems, G; Vansteenkiste, Y und Limbosch, JM**  
Stimulating effect of gastrin on cell proliferation kinetics in canine fundic mucosa. *Gastroenterology*, **62**: 583-589 (1972)
77. **Willems, G und Lehy, T**  
Radioautographic and quantitative studies on parietal and peptic cell kinetics in the mouse - a selective effect of gastrin on parietal cell proliferation. *Gastroenterology*, **69**: 416-426 (1975)
78. **Willis, P; Lynch, DA; Prescott, R und Lamonby, S**  
Cell proliferation in the post-surgical stomach, dietary salt, and the effect of *H pylori* eradication. *J Clin Pathol*, **52**: 665-669 (1999)
79. **Wong, WM und Wright NA**  
Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J Clin Pathol*, **52**: 321-333 (1999)
80. **Xu, RJ**  
Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. *Reprod Fertil Dev*, **8**: 35-48 (1996)
81. **Young, B und Heath, JW**  
Wheather's Functional Histology 4th edition. Churchill Livingstone Edinburgh, London, New York, (2002)



## IX. Anhang

### Tabellen

**Tabelle 1:** Zählergebnisse aus der Fohlen-Gruppe

<b>Fohlen Nr</b>	<b>Alter in Tagen</b>	<b>Abschnitt MDT</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>Ki-67 positiv</b>	<b>Proliferationsindex in %</b>
1	6h	Duodenum	316	96	30,38
1	6 h	Ileum	390	65	16,67
1	6 h	Caput caeci	248	23	9,27
1	6 h	Corpus caeci	245	22	8,98
1	6 h	Col.ventr.de	230	24	10,43
1	6 h	Col.ventr.sin	281	48	17,08
1	6 h	Col.dors.sin	*	*	*
1	6 h	Col.dors.de	244	40	16,39
1	6 h	Col.desc.	344	51	14,83
1	6 h	Fundus	289	17	5,88
2	1	Duodenum	427	106	24,82
2	1	Jejunum	413	100	24,21
2	1	Ileum	423	174	41,13
2	1	Caput caeci	274	29	10,58
2	1	Corpus caeci	390	85	21,79
2	1	Col.ventr.de	361	84	23,27
2	1	Col.ventr.sin	309	40	12,94
2	1	Col.dors.sin	315	82	26,03
2	1	Col.dors.de	423	113	26,71
2	1	Col.desc.	362	98	27,07
2	1	Fundus	234	15	6,41
2	1	Pylorus	409	27	6,60
2	1	Pars nongl.	278	66	23,74
2	1	Margo plic.	300	44	14,67
3	1	Duodenum	386	197	51,04
3	1	Jejunum	*	*	*
3	1	Ileum	387	159	41,09
3	1	Caput caeci	360	124	34,44
3	1	Corpus caeci	300	60	20,00
3	1	Col.ventr.de	360	120	33,33
3	1	Col.ventr.sin	390	90	23,08
3	1	Col.dors.sin	351	60	17,09
3	1	Col.dors.de	385	110	28,57
3	1	Col.desc.	263	125	47,53
3	1	Fundus	373	33	8,85
3	1	Pylorus	383	51	13,32
3	1	Pars nongl.	256	56	21,88
3	1	Margo plic.	273	54	19,78
4	2	Duodenum	335	71	21,19
4	2	Jejunum	258	43	16,67

4	2	Ileum	411	123	29,93
4	2	Caput caeci	324	53	16,36
4	2	Corpus caeci	300	85	28,33
4	2	Col.ventr.de	310	47	15,16
4	2	Col.ventr.sin	260	54	20,77
4	2	Col.dors.sin	327	105	32,11
4	2	Col.dors.de	336	70	20,83
4	2	Col.desc.	319	78	24,45
4	2	Fundus	394	48	12,18
4	2	Pylorus	*	*	*
4	2	Pars nongl.	380	64	16,84
4	2	Margo plic.	355	65	18,31
5	3	Duodenum	298	87	29,19
5	3	Jejunum	340	102	30,00
5	3	Ileum	312	113	36,22
5	3	Caput caeci	295	50	16,95
5	3	Corpus caeci	287	51	17,77
5	3	Col.ventr.de	304	48	15,79
5	3	Col.ventr.sin	245	48	19,59
5	3	Col.dors.sin	223	40	17,94
5	3	Col.dors.de	213	27	12,68
5	3	Col.desc.	230	28	12,17
5	3	Fundus	218	12	5,50
5	3	Pylorus	364	38	10,44
5	3	Pars nongl.	289	112	38,75
5	3	Margo plic.	277	75	27,08
6	5	Duodenum	367	69	18,80
6	5	Jejunum	402	69	17,16
6	5	Ileum	380	62	16,32
6	5	Caput caeci	391	60	15,35
6	5	Corpus caeci	*	*	*
6	5	Col.ventr.de	398	44	11,06
6	5	Col.desc.	327	46	14,07
6	5	Fundus	333	32	9,61
6	5	Pylorus	323	25	7,74
6	5	Pars nongl.	374	95	25,40
7	8	Duodenum	352	129	36,65
7	8	Jejunum	306	85	27,78
7	8	Caecum	444	109	24,55
7	8	Col.ventr.sin	395	95	24,05
7	8	Col.desc.	377	92	24,40
7	8	Fundus	100	4	4,00
7	8	Pylorus	360	33	9,17
7	8	Pars nongl.	305	52	17,05
7	8	Margo plic.	*	*	*
8	12	Duodenum	290	52	17,93
8	12	Jejunum	416	143	34,38
8	12	Ileum	386	151	39,12
8	12	Caput caeci	404	108	26,73
8	12	Corpus caeci	440	120	27,27

8	12	Col.ventr.de	262	46	17,56
8	12	Col.ventr.sin	282	51	18,09
8	12	Col.dors.sin	284	52	18,31
8	12	Col.dors.de	170	64	37,65
8	12	Col.desc.	302	59	19,54
8	12	Fundus	282	26	9,22
8	12	Pylorus	460	40	8,70
8	12	Pars nongl.	292	30	10,27
8	12	Margo plic.	*	*	*
9	20	Ileum	347	127	36,60
9	20	Corpus caeci	390	135	34,62
9	20	Col.ventr.de	480	123	25,63
9	20	Col.ventr.sin	470	126	26,81
9	20	Col.dors.sin	380	84	22,11
9	20	Col.dors.de	310	66	21,29
9	20	Col.desc.	305	105	34,43
9	20	Fundus	320	33	10,31
10	20	Duodenum	420	187	44,52
10	20	Jejunum	360	127	35,28
10	20	Caecum	*	*	*
10	20	Col.ventr.sin	345	125	36,23
10	20	Col.desc.	320	106	33,13
10	20	Fundus	402	63	15,67
10	20	Pylorus	380	63	16,58
10	20	Pars nongl.	315	60	19,05
10	20	Margo plic.	*	*	*
11	43	Duodenum	474	203	42,83
11	43	Jejunum	513	190	37,04
11	43	Ileum	421	164	38,95
11	43	Caput caeci	479	178	37,16
11	43	Corpus caeci	490	173	35,31
11	43	Col.ventr.de	549	252	45,90
11	43	Col.ventr.sin	434	201	46,31
11	43	Col.dors.sin	549	230	41,89
11	43	Col.dors.de	433	152	35,10
11	43	Col.desc.	497	216	43,46
11	43	Fundus	373	60	16,09
11	43	Pylorus	430	81	18,84
11	43	Pars nongl.	372	138	37,10
11	43	Margo plic.	*	*	*

**Tabelle 2:** Zählergebnisse aus der Adulten-Gruppe

<b>Adultes Nr</b>	<b>Alter in Jahren</b>	<b>Abschnitt MDT</b>	<b>Zellen gesamt</b>	<b>Ki-67 positiv</b>	<b>Proliferationsindex in %</b>
1	6	Duodenum	410	100	24,39
1	6	Jejunum	550	127	23,09
1	6	Ileum	456	114	25,00
1	6	Caput caeci	480	102	21,25
1	6	Corpus caeci	410	73	17,80
1	6	Col.ventr.de	408	128	31,37
1	6	Col.ventr.sin	416	151	36,30
1	6	Col.dors.sin	378	102	26,98
1	6	Col.dors.de	400	88	22,00
1	6	Col.desc.	245	90	36,73
1	6	Fundus	325	47	14,46
1	6	Pylorus	344	61	17,73
1	6	Pars nongl.	330	65	19,70
1	6	Margo plic.	298	117	39,26
2	8	Duodenum	412	149	36,17
2	8	Jejunum	423	166	39,24
2	8	Ileum	430	159	36,98
2	8	Caput caeci	394	98	24,87
2	8	Corpus caeci	420	100	23,81
2	8	Col.ventr.de	360	68	18,89
2	8	Col.ventr.sin	407	95	23,34
2	8	Col.dors.sin	485	150	30,93
2	8	Col.dors.de	368	92	25,00
2	8	Col.desc.	315	90	28,57
2	8	Fundus	376	82	21,81
2	8	Pylorus	350	90	25,71
2	8	Pars nongl.	365	93	25,48
2	8	Margo plic.	*	*	*
3	10	Duodenum	430	160	37,21
3	10	Jejunum	251	121	48,21
3	10	Ileum	415	126	30,36
3	10	Caput caeci	402	109	27,11
3	10	Corpus caeci	467	114	24,41
3	10	Col.ventr.de	362	117	32,32
3	10	Col.ventr.sin	358	84	23,46
3	10	Col.desc.	*	*	*
3	10	Fundus	368	56	15,22
3	10	Pylorus	415	128	30,84
3	10	Pars nongl.	308	72	23,38
3	10	Margo plic.	*	*	*
4	17	Duodenum	450	130	28,89
4	17	Jejunum	402	141	35,07
4	17	Caput caeci	*	*	*
4	17	Corpus caeci	480	164	34,17
4	17	Col.dors.sin	410	77	18,78

4	17	<i>Col.desc.</i>	310	85	27,42
4	17	<i>Fundus</i>	360	54	15,00
4	17	<i>Pylorus</i>	480	80	16,67
4	17	<i>Pars nongl.</i>	356	58	16,29
4	17	<i>Margo plic.</i>	*	*	*
5	19	<i>Duodenum</i>	425	133	31,29
5	19	<i>Jejunum</i>	351	108	30,77
5	19	<i>Ileum</i>	446	118	26,46
5	19	<i>Caput caeci</i>	440	106	24,09
5	19	<i>Corpus caeci</i>	437	90	20,59
5	19	<i>Col.ventr.sin</i>	372	75	20,16
5	19	<i>Col.desc.</i>	440	104	23,64
5	19	<i>Fundus</i>	304	42	13,82
5	19	<i>Pylorus</i>	310	47	15,16
5	19	<i>Pars nongl.</i>	307	80	26,06
5	19	<i>Margo plic.</i>	298	94	31,54
6	22	<i>Duodenum</i>	392	138	35,20
6	22	<i>Jejunum</i>	325	103	31,69
6	22	<i>Ileum</i>	366	80	21,86
6	22	<i>Caput caeci</i>	320	66	20,63
6	22	<i>Corpus caeci</i>	430	112	26,05
6	22	<i>Col.ventr.de</i>	415	107	25,78
6	22	<i>Col.ventr.sin</i>	390	69	17,69
6	22	<i>Col.dors.sin</i>	400	86	21,50
6	22	<i>Col.dors.de</i>	413	81	19,61
6	22	<i>Col.desc.</i>	440	90	20,45
6	22	<i>Fundus</i>	*	*	*
6	22	<i>Pylorus</i>	404	52	12,87
6	22	<i>Pars nongl.</i>	212	16	7,55
6	22	<i>Margo plic.</i>	*	*	*
7	24	<i>Duodenum</i>	*	*	*
7	24	<i>Jejunum</i>	*	*	*
7	24	<i>Ileum</i>	*	*	*
7	24	<i>Caput caeci</i>	391	85	21,74
7	24	<i>Corpus caeci</i>	*	*	*
7	24	<i>Col.ventr.de</i>	366	110	30,05
7	24	<i>Col.ventr.sin</i>	305	92	30,16
7	24	<i>Col.dors.sin</i>	360	113	31,39
7	24	<i>Col.dors.de</i>	341	131	38,42
7	24	<i>Col.desc.</i>	292	88	30,14
7	24	<i>Fundus</i>	285	61	21,40
7	24	<i>Pylorus</i>	289	86	29,76
7	24	<i>Pars nongl.</i>	250	58	23,20
7	24	<i>Margo plic.</i>	351	96	27,35

\* Proben waren aufgrund von Gewebeschäden bzw. fehlerhafter Fixierung nicht auswertbar

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. Kressin möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ralph Brehm für die kompetente fachliche Hilfe und die durch die Zusammenarbeit entstandene Freundschaft.

Vielen Dank an Roswitha Weigel und an Martina Fink, die mit ihrer Hilfe bei der technischen Durchführung der Arbeit zur Seite standen. Außerdem ein Dank an Frau Dr. Carola Lang für die ‚computerseitige‘ Hilfe und die lustige Zeit während ihrer Tätigkeit an der JLU Giessen. Ein Dankeschön auch an Herrn Ralph Blakey und Herrn Peter Keil für die lockere Arbeitsatmosphäre und die netten Gespräche zwischendurch.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. K. Failing und seinen Mitarbeitern für die geduldige statistische Beratung.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und – Embryologie danke ich für das angenehme und fröhliche Arbeitsklima.

Ein „Mmhaie“ an die Tierärzte Prange und Dünner.

An dieser Stelle möchte ich Barbara ganz lieben Dank sagen für die Geduld und den manchmal doch nötigen Ansporn ‚dranzubleiben‘ und wünsche ihr hiermit alles Gute für ihre Dissertation.

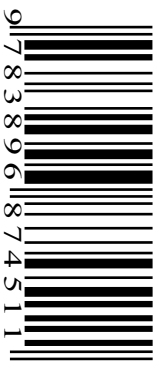
Never express yourself more clearly than you are able

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-451-9



9 783896 874511